

Untersuchungen zur Bedeutung der fest am Kopplungsfaktor gebundenen Nukleotide bei der Photophosphorylierung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der
philosophischen Doktorwürde
der
PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
der
UNIVERSITÄT ZÜRICH

vorgelegt von
STEFAN BODMER
von Zürich (ZH)

Begutachtet von
Herrn Prof. Dr. R. Bachofen

ADAG Administration & Druck AG

Zürich 1980

Untersuchungen zur Bedeutung der fest am Kopplungsfaktor gebundenen Nukleotide bei der Photophosphorylierung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der
philosophischen Doktorwürde
der
PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
der
UNIVERSITÄT ZÜRICH

vorgelegt von
STEFAN BODMER
von Zürich (ZH)

Begutachtet von
Herrn Prof. Dr. R. Bachofen

ADAG Administration & Druck AG

Zürich 1980



INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1.1. ZUM MECHANISMUS DER PHOSPHORYLIERUNG: HYPOTHESEN	4
1.2. KOPPLUNGSFAKTOREN DER PHOTOPHOSPHORYLIERUNG	10
1.3. NUKLEOTIDBINDUNGEN AM KOPPLUNGSFAKTOR	11
1.4. PROBLEMSTELLUNG	14

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. PRÄPARATION DES BIOLOGISCHEN MATERIALS

2.1.1. Zur Wahl des biologischen Materials	16
2.1.2. Präparation von Spinatchloroplasten	17
2.1.3. Isolierung und Reinigung der Kopplungsfaktor- ATPase (CF_1)	18

2.2. EXPERIMENTE

2.2.1. Steady-state-Phosphorylierung	21
2.2.2. Phosphorylierung ohne exogene Nukleotide	22
2.2.3. Austauschmarkierung	23
2.2.4. Entfernen der freien Nukleotide von Membranen	23
2.2.5. Trennung des Kopplungsfaktors von stabilisierendem ATP	23

2.3. EXTRAKTION DER FESTGEBUNDENEN NUKLEOTIDE 24

2.4. ANALYSE DES NUKLEOTIDEXTRAKTES

2.4.1. Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	25
2.4.2. Enzymatische Nukleotidbestimmung	29

2.5. ANALYTISCHE METHODEN	
2.5.1. Chlorophyllbestimmung	30
2.5.2. Proteinbestimmungen	30
2.5.3. ATPase-Aktivität	30
2.5.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	30
2.5.5. Bestimmung des total veresterten Phosphats	31
2.5.6. Radioaktivitätsmessungen	32
2.6. CHEMIKALIEN	32
3. VORVERSUCHE	
EINLEITUNG	33
3.1. STEADY-STATE-PHOSPHORYLIERUNG UND AUSTAUSCHREAKTION	34
3.2. WEGWASCHEN VON FREIEN NUKLEOTIDEN	37
3.3. EXTRAKTION DER FESTGEBUNDENEN ADENINNUKLEOTIDE	38
3.4. STABILITÄT DER NUKLEOTIDE WÄHREND DER EXTRAKTION	40
3.5. NEUTRALISATION DES EXTRAKTES UND TRENNUNG DER NUKLEOTIDE	42
4. HAUPTVERSUCHE	
4.1. ISOLIERUNG UND REINIGUNG DES KOPPLUNGSFAKTORS (CF_1) AUS SPINATCHLOROPLASTEN	45
4.2. AUFTRENNUNG DES EXTRAKTES	51
4.3. NUKLEOTIDE AM KOPPLUNGSFAKTOR AUS CHLOROPLASTEN OHNE VORBELICHTUNG	53
4.4. FESTGEBUNDENE NUKLEOTIDE NACH PHOSPHORYLIERUNG	55
4.5. FESTGEBUNDENE NUKLEOTIDE NACH AUSTAUSCHREAKTION	55
4.6. DER EINFLUSS DES ADENYLATKINASE-INHIBITORS AP_5A	56
4.7. DER EINFLUSS VON PHLORIZIN AUF DIE NUKELOTIDE AM CF_1	58
4.8. PHOSPHORYLIERUNG DER ENDOGENEN NUKLEOTIDE	58

4.9. ZUSAMMENFASSUNG DER RESULTATE UND DISKUSSION	60
4.9.1. Zum Verhalten der festgebundenen Adenin- nukleotide unter verschiedenen Bedingungen	61
4.9.2. Zur Natur des primären Phosphatakzeptors	63
4.9.3. Ein Modell zum Reaktionsablauf der ATP-Synthese	66
5. ZUSAMMENFASSUNG	71
6. LITERATURVERZEICHNIS	72
7. ANHANG	
7.1. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	79
7.2. VERDANKUNGEN	80

1. EINLEITUNG

1.1. ZUM MECHANISMUS DER PHOSPHORYLIERUNG : HYPOTHESEN

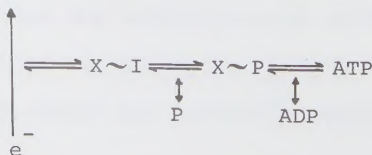
Der Mechanismus der elektronentransportabhängigen Bildung von ATP ist heute immer noch eines der grossen ungelösten Probleme der Biochemie.

Trotzdem sowohl in der oxidativen wie in der photosynthetischen Phosphorylierung viele beteiligte Komponenten und Teilreaktionen bekannt sind, bewegt sich die Diskussion über die Art der Energiekopplung immer noch auf dem Niveau von Hypothesen.

Die Reaktionen in Mitochondrien, Chloroplasten und Bakterienmembranen zeigen viele Gemeinsamkeiten: alle Vorgänge sind an vergleichbare Membranstrukturen gebunden, in welchen analoge Elektronentransport-Komponenten enthalten sind. In allen beschriebenen energieumsetzenden Membranen erfolgt die ATP-Synthese an einem vergleichbaren Enzym, dem Kopplungsfaktor, dessen Charakterisierung bei so verschiedenen biologischen Systemen wie *Escherichia coli*, Rinderherz-Mitochondrien und Spinatchloroplasten keine wesentlichen Unterschiede zeigte.

Auf Grund dieser weitgehenden Aehnlichkeiten wird heute allgemein angenommen, dass in den erwähnten Membransystemen ein prinzipiell gleicher Mechanismus für die ATP-Bildung verantwortlich ist.

Im wesentlichen werden drei Hypothesen diskutiert; allen gemeinsam sind zwei energiereiche Zwischenprodukte $X\sim I$ und $X\sim P$.



Während man sich einig ist, dass das zweite energiereiche Zwischenprodukt (X-P) phosphoryliert sei, differieren die Hypothesen bezüglich der Natur des ersten Zwischenproduktes (X-I). Slater et al. (1) vermuten in X-I eine isolierbare chemische Verbindung. Demgegenüber betrachtet Mitchell das X-I als einen durch gerichteten Wasserstoffionen-Transport aufgebauten pH-Gradienten verbunden mit einem Membranpotential (2).

Die Hypothese der konformativen Kopplung von Boyer et al (3) sieht in X-I eine durch Elektronentransport gebildete energiereiche Konformation einer Komponente, welche beim Uebergang in einen energieärmeren Zustand Arbeit verrichten kann. Konformationsänderungen sind auch im Kopplungsfaktor während der ATP-Synthese selbst wahrscheinlich.

Der Nachweis eines nicht phosphorylierten ersten Zwischenproduktes gelang Hind und Jagendorf (4), indem sie zeigen konnten, dass eine im Licht inkubierte Chloroplastensuspension in einer nachfolgenden Dunkelphase aus ADP und anorganischem Phosphat in der Lage war ATP zu synthetisieren. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Komponenten des photosynthetischen Elektronentransportes innerhalb der Chloroplastenmembran so angeordnet sind, dass ein elektrochemischer Gradient von Protonen die Folge eines Elektronentransportes sein muss (5). Schliesslich zeigten Jagendorf und Uribe (6), dass ein durch Säuren-Basen Uebergang künstlich aufgebauter Protonengradient die Photophosphorylierung in Chloroplastenmembranen antreiben kann.

Zusammen mit der erfolglosen Suche nach einem isolierbaren, chemischen Zwischenprodukt X-I gaben diese Resultate der chemischen osmotischen Hypothese von Mitchell grossen Auftrieb.

Daneben gibt es aber auch Resultate, welche auf eine chemische oder konformative Hypothese der Kopplung hinweisen. So gelang es Chance (7), energiereiche nicht phosphorylierte Membrankomponenten nachzuweisen. Weiter könnten auch die von Jagendorf (8) beobachteten energieabhängigen Konformationsänderungen des Kopplungsfaktors diese Hypothese stützen.

Auf Grund der erbrachten Resultate ist es auch heute nicht möglich, die eine oder andere Art der Kopplung auszuschliessen.

Das zweite Zwischenprodukt scheint aufgrund von Untersuchungen der enzymatischen Austauschreaktionen mit radioaktivem Sauerstoff phosphoryliert zu sein (8). Anfänglich wurde vermutet, dass es sich dabei um phosphorylierte Proteine handeln könnte, welche auch tatsächlich in energieumsetzenden Membranen gefunden werden konnten (9). Weder aus Mitochondrien und Chloroplasten noch aus Bakterienmembranen war es aber je möglich, ein wirklich energiereiches Phosphoprotein zu isolieren, das mit ADP zusammen hätte ATP bilden können.

Heute wird allgemein auf Grund von Arbeiten aus verschiedenen Forschungsgruppen angenommen, dass X-P gleichzustellen ist mit den fest an den Kopplungsfaktor gebundenen Adennukleotiden (siehe Kapitel 1.3.).

Nachdem anfänglich vor allem die Art der durch einen Elektronentransport erzeugten Energie die ATP-Synthese-Forschung beschäftigte, gilt das Interesse heute vorwiegend der Verwendung dieser Energie.

Während man früher annahm, dass diese Energie zur Bildung der ADP-P-Anhydridbindung ausgenützt werde, konnten in neueren Arbeiten gute Hinweise gefunden werden, dass die Energie nicht zur Veresterung des Phosphates gebraucht wird, sondern zur Freisetzung von gebundenem ATP (10/11).

Ein weiteres noch ungelöstes Problem ist die Natur des primären Phosphataktzeptors. Smith et al. (12) schliessen aus ihren Resultaten eine direkte Phosphorylierung von exogenem AMP zu ATP aus. Allerdings könnte die Beobachtung, dass während der Phosphorylierung Phosphat neben der γ -Stellung im ATP auch in die β -Position von ADP und ATP eingebaut wird auf eine intermediäre Beteiligung von gebundenem AMP hinweisen (13/14).

Auch die zur ATP-Synthese vorgeschlagenen Hypothesen weisen einige Gemeinsamkeiten auf. Grundlage aller postulierter Mechanismen bildet eine membrangebundene Proteinkomponente, Kopplungsfaktor oder ATPase genannt (siehe Kapitel 1.2.). Weiter gemeinsam sind Adeninnukleotide, welche am ATPase-Komplex gebunden sind (siehe Kapitel 1.3.).

Nach der Hypothese von Roy und Moudrianakis (15) wird AMP als primärer Phosphataktzeptor energieabhängig zu ADP phosphoryliert. Durch nachfolgende Transphosphorylierung -Phosphattransfer auf ein zweites ADP- kommt es zur Bildung von ATP.

Die zwei anderen Hypothesen enthalten beide ADP als primären Phosphatakzeptor, unterscheiden sich jedoch in der Art der Energieausnützung und der Herkunft des freien ATP.

Die Hypothese von Boyer et al. (16) beinhaltet zwei absolut identische Bindungsstellen für ADP am Kopplungsfaktor.

Die Bildung von ATP erfolgt ohne Energie, die Freisetzung hingegen kann nur durch eine mittels Energetisierung induzierte Konformationsänderung des Kopplungsfaktors ermöglicht werden.

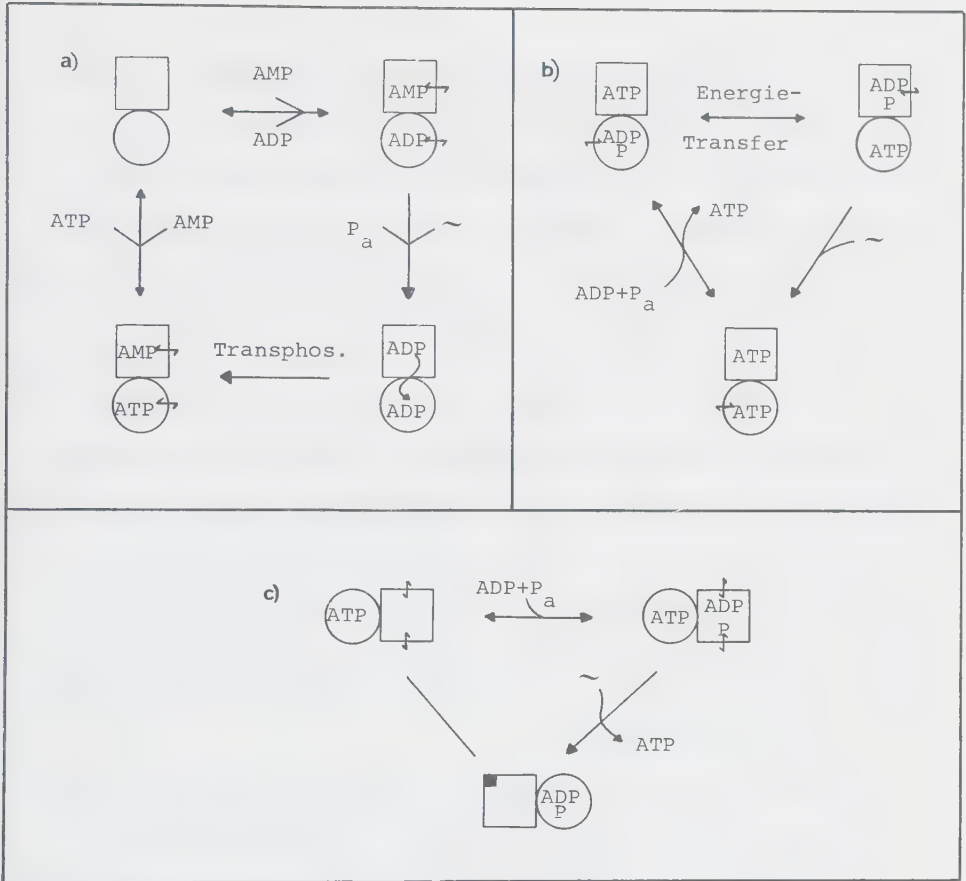
Es werden also mindestens zwei wichtige Schritte der ATP-Bildung unterschieden: Die Bindung von ADP und anorganischem Phosphat an den Kopplungsfaktor unter Bildung von fest gebundenem ATP und die energieabhängige Freisetzung des gebildeten ATP.

Die Hypothese von Lutz et al. (17) schliesslich sieht zwei unterschiedliche Bindungsstellen für ADP vor.

An der ersten Bindungsstelle wird aus ADP und exogenem Phosphat in einer lichtabhängigen Reaktion ATP gebildet.

Die Hydrolyse dieses energieabhängig gebildeten ATP soll nun die Veresterung von ADP und Phosphat an der zweiten Bindungsstelle ermöglichen. Die Freisetzung dieses an der zweiten Bindungsstelle gebundenen ATP geschieht gleichzeitig mit der erneuten energieabhängigen Bildung von ATP an der ersten Bindungsstelle.

Die drei vorgeschlagenen Hypothesen sind in der nachfolgenden Figur 1 kurz zusammengefasst.



Figur 1: HYPOTHESEN ZUM MECHANISMUS DER ATP-SYNTHESE

- a) Hypothese nach Roy und Moudrianakis (15)
- b) Hypothese nach Lutz et al. (17)
- c) Hypothese nach Boyer et al. (16)

□, ○ repräsentieren zwei Adeninnukleotid-Bindungsstellen am Kopplungsfaktor; $\rightleftharpoons$ zeigt an, dass Austauschreaktionen mit exogenen Nukleotiden möglich sind; □ steht für eine Bindungsstelle, die nicht im Gleichgewicht steht mit dem wässrigen Medium.

(abgeändert nach Harris (19))

1.2. KOPPLUNGSFAKTOREN DER PHOTOPHOSPHORYLIERUNG

Elektronentransport getriebene Phosphorylierungssysteme sind eng mit einer Membran verbunden, so mit der inneren Mitochondrienmembran, der Thylakoidmembran oder der bakteriellen Cytoplasmamembran. Dabei erweist sich die substanziell intakte Membran als absolut notwendig für die Phosphorylierung. Ein Verlust der vesikulären Struktur, beispielsweise durch Behandlung mit Detergenzien, geht einher mit dem Verlust der Phosphorylierungsaktivität (18). Auf Grund dieser Notwendigkeit einer intakten Membran könnten alle Membrankomponenten - Proteine, Lipide, Lipoproteide - als Kopplungsfaktoren bezeichnet werden. Es ist wahrscheinlich, dass all diese Komponenten eine Rolle bei der ATP-Synthese spielen, so dass man grundsätzlich zwei Arten von Faktoren unterscheidet:

- strukturelle Faktoren, welche die Membran in derjenigen Konformation stabilisieren, die für die Funktion der direkt bei der ATP-Synthese beteiligten Kopplungsfaktoren notwendig ist,
- funktionelle Faktoren, welche in der ATP-Synthese eine direkte katalytische Rolle spielen.

Diese zwei Funktionen von Kopplungsfaktoren müssen sich gegenseitig nicht ausschliessen und es ist daher naheliegend anzunehmen, dass katalytisch aktive Proteine auch eine entscheidende strukturelle Funktion ausüben.

Im folgenden beschränke ich den Ausdruck 'Kopplungsfaktor' auf diejenige Membrankomponente, welche direkt an der ATP-Synthese beteiligt ist.

Die molekulare Organisation der ATP-Synthese erscheint bei verschiedenen Lebensformen sehr ähnlich. Der Kopplungsfaktor aus Mitochondrien, Chloroplasten und bakteriellen Zellmembranen (ATPase) kann in zwei Teile unterteilt werden, welche mit F_1 -ATPase und F_0 -ATPase bezeichnet sind.

Der F_1 -Teil des ATPase-Komplexes enthält normalerweise fünf Polypeptiduntereinheiten ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$), welche sich in Form einer etwa 90 Å grossen Kugel aus der Membran herausheben. Dieser Teil ist notwendig für die membrangebundene ATP-Synthese und enthält auch die enzymatische Aktivität für die Rückreaktion, die Hydrolyse von ATP zu ADP und P_a .

Der F_0 -Teil des ATPase-Komplexes ist fest in die Membran eingebettet und ihm wird die Funktion eines Protonen-Kanal zugeschrieben.

1.3. NUKLEOTIDBINDUNGEN AM KOPPLUNGSFAKTOR

Aus den verschiedenen Modellvorstellungen zum Mechanismus der Phosphorylierung (Kapitel 1.1.) geht hervor, dass den membrangebundenen Nukleotiden eine bedeutende Funktion beigemessen wird.

Im Falle von Spinatchloroplasten kann der Kopplungsfaktor (CF_1) durch relativ milde Behandlung von der Membran abgelöst werden. Parallel dazu werden auch die gebundenen Nukleotide von der Membran entfernt, was darauf hinweist, dass die membrangebundenen Nukleotide an den ATPase-Molekülen gebunden sind.

Die membrangebundene ATPase katalysiert den terminalen Schritt der ATP-Synthese (Veresterung von ADP und P_a). Dieselbe ATPase, membrangebunden oder herausgelöst, besitzt aber auch die Fähigkeit ATP zu hydrolysieren, wenn diese Aktivität in einigen Präparationen auch latent ist. Diese beiden Funktionen des Kopplungsfaktors implizieren mindestens je eine Bindungsstelle für ADP und ATP am gleichen Molekül. Die Beziehung zwischen diesen mutmasslichen Bindungsstellen ist nicht eindeutig geklärt. Meistens wird angenommen, dass die Synthese und Hydrolyse von ATP an der gleichen Stelle am Enzym ablaufen (19), doch die Existenz von total unabhängigen Bindungsstellen für die beiden Aktivitäten kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden (20).

Die wichtigste Funktion der Kopplungsfaktor-ATPase besteht also in der Interaktion mit Adeninukleotiden. Das Studium dieser Interaktionen wird denn auch sehr intensiv vorangetrieben, denn man erhofft sich aus den Ergebnissen Einblick in die terminalen Schritte der Phosphorylierung. Ein kürzlich erschienener Uebersichtsartikel von D.A.Harris (19) fasst den heutigen Stand dieser Arbeiten zusammen. Es zeigt sich, dass die bis anhin erarbeiteten Daten ein Bild ergaben, welches auf eine recht komplexe Natur dieser Interaktionen schliessen lassen.

Es wurden prinzipiell zwei verschiedene Arten von Bindungsstellen gefunden, welche sich in der Affinität stark unterscheiden. Bindungsstellen für Adeninukleotide mit relativ kleiner Affinität, welche eine grosse Austauschrate erlauben, wie die hohen gemessenen Raten der ATP-Synthese und Hydrolyse es erfordern, sind beschrieben worden (loosely bound).

Daneben sind aber Bindungsstellen charakterisiert worden, welche Adeninukleotide praktisch irreversibel binden können (tightly bound). Die Bezeichnung 'festgebunden' ist methodischen Ursprungs und beinhaltet keine Aussage über die Art der Bindung. Sie bedeutet nur, dass die Nukleotide nach Entfernen aller freien Nukleotide (loosely bound und free) von den Membranen oder abgelösten Proteinen -durch Zentrifugation, Membranfiltration oder Gelchromatographie- noch stabil gebunden bleiben an diesen gewaschenen biologischen Membranen oder Proteinen. Die Dissoziationskonstante dieser festgebundenen Nukleotide ist so klein, dass beispielsweise gebundenes ATP nicht durch ATP-verbrauchende Enzyme wie Hexokinase oder Luciferase angegriffen werden kann. Dass aber die Bindung nicht kovalent sein kann geht aus der Beobachtung hervor, dass die Nukleotide alleine durch Kältebehandlung vom Protein abgelöst werden können (21).

Derart festgebundene Nukleotide können an den meisten bisher untersuchten energieumsetzenden Membranen und deren isolierten Kopplungsfaktoren nachgewiesen werden. Die Zahl der Nukleotide schwankt jedoch je nach Autor und Methode zwischen eins und fünf Adeninukleotide pro Kopplungsfaktor (19). Harris und Slater (22) haben am Spinat-Kopplungsfaktor drei Bindungsstellen gefunden, eine für ATP und zwei für ADP. Fest gebundenes AMP konnte bisher -wenn überhaupt- nur in sehr geringen Mengen festgestellt werden.

Die Rolle dieser festgebundenen Adeninukleotide innerhalb der ATP-Synthese ist Gegenstand von Hypothesen. Dabei ergibt sich scheinbar ein Widerspruch zwischen der hohen Affinität zum

Kopplungsfaktor und der für eine intermediäre Funktion erforderlichen hohen Austauschrate. Unter der Annahme jedoch, dass die Bindungseigenschaften am Kopplungsfaktor nicht statisch sind, sondern während des Ablaufs der Phosphorylierung einem ständigen Wechsel unterliegen, könnten sehr wohl auch festgebundene Nukleotide Intermediärprodukte der ATP-Synthese repräsentieren. Resultate aus verschiedenen Arbeitsgruppen, welche einen Austausch zwischen festgebundenen und freien Nukleotiden unter Energetisierung der Membranen zeigen (23/24/25) mögen auf die Richtigkeit dieser Annahme hinweisen.

1.4. PROBLEMSTELLUNG

Die Aufklärung der Elektronentransportgetriebenen ATP-Synthese in photosynthetischen Membranen bekam durch die Entdeckung der festgebundenen Adennukleotide neuen Auftrieb. Die Interaktionen zwischen Kopplungsfaktor und Nukleotiden wurden jedoch vorwiegend an der isolierten, aus der Membran herausgelösten ATPase untersucht (Zusammenfassung Ref.19). Untersuchungen an der intakten Membran, welche letztlich notwendig sind um die am isolierten System gewonnenen Aussagen auf ihre physiologische Bedeutung zu überprüfen, fehlten fast ganz.

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, das Verhalten der festgebundenen Nukleotide an der intakten Membran unter physiologischen Bedingungen zu studieren, sowie den Einfluss von verschiedenen Hemmstoffen auf die Nukleotidinteraktionen zu untersuchen. Dabei sollte aus den verschieden vorbehandelten

Membranen der Kopplungsfaktor-Nukleotid-Komplex isoliert, gereinigt und analysiert werden.

Unter der Annahme, dass während der Reinigung der ATPase möglichst keine Veränderungen dieses Komplexes ablaufen, sollten aus dem Gehalt und der Zusammensetzung der festgebundenen Nukleotide Rückschlüsse auf den Mechanismus der ATP-Synthese gezogen werden können.

Eine zu diesem Zwecke ausgearbeitete Bestimmungsmethode erlaubte eine quantitative Analyse der Nukleotide in sehr kleinen Mengen (ca 10^{-10} Mol).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. PRAEPARATION DES BIOLOGISCHEN MATERIALS

2.1.1. Zur Wahl des biologischen Materials

Als biologisches Versuchsobjekt für die vorliegende Arbeit wurden Chloroplasten aus Spinat gewählt.

Bisher wurden Chloroplasten vor allem zum Studium von drei Problemkreisen isoliert: a) Untersuchungen zum Elektronen-Transport, zur Phosphorylierung und Sauerstofffreisetzung, b) Arbeiten über die CO_2 -Fixierung und c) Untersuchungen der enzymatischen und strukturellen Komponenten des photosynthetischen Apparates. In der Literatur finden sich unzählige Varianten zur Präparation von Chloroplasten; die Fragestellung, zu deren Lösung die Thylakoidmembranen dienen sollen, bestimmt dabei weitgehend die Wahl des Ausgangsmaterials sowie die Extraktionsmethode.

Spinat ist aus verschiedenen Gründen ein ideales Ausgangsmaterial:

- Spinatblätter sind praktisch das ganze Jahr erhältlich
- die Nervatur lässt sich relativ einfach entfernen
- die Vakuolen sind weitgehend frei von endogenen Inhibitoren und enthalten meistens nur kleine Mengen an Stärke und Kalziumoxalat.

Aus diesen Gründen können aus Spinat normalerweise Chloroplasten von sehr guter Qualität mit relativ einfachem Prozedere isoliert werden. Die physiologische Aktivität der erhaltenen Membranpräparationen variiert jedoch je nach Jahreszeit und Herkunft des Ausgangsmaterials.

Wegen der grossen Vorteile von Spinat gegenüber anderen Ausgangsmaterialien werden sehr viele Arbeiten zum Mechanismus der Photosynthese an diesem Objekt durchgeführt, wodurch die Möglichkeit des Vergleichs von Resultaten erleichtert wird.

2.1.2. Präparation von Spinatchloroplasten

Spinatchloroplasten wurden in Anlehnung an eine von Strotman et al. (25) beschriebene Methode präpariert.

Spinatblätter vom lokalen Markt wurden in kaltem Wasser gewaschen, entnervt und abgetrocknet. In einigen Fällen wurden die Blätter vor der Isolation der Chloroplasten über Nacht im Dunkeln und bei 4 °C aufbewahrt. Die Präparation wurde im Dunkeln und bei 4 °C (Kühlraum) durchgeführt:

200 Gramm Spinatblätter wurden in einem Küchenmixer mit 300 ml Isolations-Medium (0.3M Saccharose, 50mM NaCl, 1mM MgCl₂ und 10mM Tricine-Puffer, pH 7,8) während fünfzehn Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wurde durch eine dreifache Schicht Käsetuch durchgepresst und die Chloroplasten im Filtrat abzentrifugiert (10 Minuten, 3000g, 4°C).

Die isolierten Chloroplasten im Sediment wurden einmal mit dem Isolationsmedium und zweimal mit einem hypotonischen Medium (50mM NaCl, 1mM MgCl₂ und 2mM Tricine-Puffer, pH 7.8) gewaschen. Schliesslich wurden die Partikel im Versuchspuffer des nachfolgenden Ansatzes (siehe Kapitel 2.2.) bei einer Chlorophyllkonzentration von 2mg/ml aufgenommen.

2.1.3. Isolierung und Reinigung der Kopplungsfaktor-ATPase (CF_1)

Isolierung des Rohextraktes

Zu Beginn der Arbeit wurde eine von Lien und Racker (26) publizierte Methode verwendet:

Die gewaschenen Chloroplastenfragmente werden in einer 10mM NaCl-Lösung einmal nachgewaschen und dann bei Zimmertemperatur in einer 0.75mM EDTA-Lösung, pH 7.6, bei einer Chlorophyllkonzentration von 0.1mg/ml entkoppelt, indem die Suspension unter pH-Kontrolle während fünfzehn Minuten gerührt wird (Magnetrührer). Anschliessend folgt eine dreissigminütige Zentrifugation (20'000g bei 20°C). Das Sediment stellt die entkoppelten Fragmente dar, der Ueberstand enthält grösstenteils den Kopplungsfaktor der Photophosphorylierung ($=CF_1$).

Wegen der Kälteelabilität des isolierten CF_1 müssen alle folgenden Schritte bei Zimmertemperatur durchgeführt werden. Der EDTA-Ueberstand (CF_1 -Rohextrakt) wird durch Zugabe von Tris- SO_4 , ATP sowie EDTA gepuffert und stabilisiert. Die Reinigung der ATPase geschieht über zwei Säulen DEAE-Sephadex A-50 und anschliessendem Saccharose-Dichtegradienten (8-25% w/v). Die gelelektrophoretische Analyse des Präparates zeigte keine nennenswerten Verunreinigungen (unter 5%). Diese Präparationsmethode hatte aber den grossen Nachteil, dass sie mit total vier Tagen sehr zeitaufwendig war und deshalb eher für strukturelle Untersuchungen am Protein als zur Lösung von mechanistischen Fragestellungen der Phosphorylierung geeignet schien.

Deshalb wurden später Methoden verwendet, welche wesentlich schneller und mit weniger Materialaufwand zu einer ebenso guten Kopplungsfaktor-Präparation führten.

a) Nach einer von Binder et al. (27) ausgearbeiteten Methode wird zum EDTA-Rohextrakt direkt genügend (1ml pro 3mg Chlorophyll) DEAE-Cellulose (Whatman DE 22 in 50mM Tris-HCl pH 7.8, 1mM ATP und 2mM EDTA) zugegeben und während 15 Minuten gerührt (Magnet-rührer, pH-Kontrolle). Das während der Entkopplung abgelöste Protein wird auf diese Weise an die Cellulose gebunden. Die DEAE-Cellulose wird dann auf einem Glasfaser-Filter (Miracloth, Calbiochem) abgetrennt und die daran adsorbierten Membranfragmente mit viel Waschpuffer (50mM Tris-HCl pH 7.8, 1mM ATP, 2mM EDTA) gewaschen. Durch erhöhte Ionenstärke (Waschpuffer + 0.4-0.6M NaCl) kann der rohe Kopplungsfaktor in einem kleinen Volumen von der Cellulose abgelöst und durch Zentrifugation (30 Minuten bei 150'000g) von den verbleibenden Partikeln getrennt werden.

Der gelbliche Rohextrakt wurde mittels Ultrafiltration (Diaflo-Membran XM-50) auf eine Proteinkonzentration von 5-8mg/ml eingengt und entweder direkt über einen Saccharosegradienten gereinigt oder durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat ausgefällt (55% Sättigung).

b) Beechey et al. (28) beschrieben eine schnelle und einfache Präparationsmethode für den mitochondrialen Kopplungsfaktor, welche für das Chloroplasten-System durch Younis et al (29) modifiziert wurde. Dazu werden die Chloroplasten bei Zimmertemperatur und einer Chlorophyllkonzentration von 2.5-3mg/ml

in folgendem Puffer aufgenommen: 10mM Tris-SO₄ pH 7.6, 250mM Saccharose, 1mM EDTA, 2mM ATP und 5mM DTT. Zu dieser Suspension wird Chloroform (halbes Volumen) zugegeben und der Ansatz während fünfzehn Sekunden von Hand geschüttelt. Im unmittelbar folgenden Zentrifugationsschritt (40 Minuten bei 300g) werden die Phasen getrennt und anschliessend die wässrige Phase vorsichtig abgesaugt, die darin verbleibenden Membranfragmente durch Zentrifugation (30 Minuten bei 200'000g) abgetrennt und der goldgelbe Ueberstand durch Ultrafiltration (Diaflo XM-50) konzentriert. Die ursprüngliche Reinigung mittels Gelfiltration (Sephadex G-200) wurde ersetzt durch Dichtegradienten-Zentrifugation (10-25% w/v).

c) Nach einer von Strotman et al (30) erarbeiteten Methode werden die Chloroplasten zuerst mit verdünntem Salz-Medium (10mM NaPP pH 7.4) gewaschen, wobei vorwiegend die Ribulose-1,5-diPhosphat-Carboxylase weggelöst wird. Aus den vorgewaschenen Membranen lässt sich der Kopplungsfaktor herauslösen durch Tricine-Puffer 2mM pH 7.8, der 300mM Saccharose enthält. Nach Ultrazentrifugation (60 Minuten bei 150'000g, 20°C) erhält man den Kopplungsfaktor-Rohextrakt im Ueberstand, der durch Ultrafiltration (Diaflo XM-50) eingeengt wird.

Reinigung durch Dichtegradienten-Zentrifugation

Je nach verwendeter Isolierungsmethode enthalten die Rohextrakte neben dem Kopplungsfaktor noch einige niedermolekulare Proteine und grössere Mengen an Ribulose-1,5-diPhosphat-Carboxylase. Zur reinen Darstellung der ATPase wurden diese Verunreinigungen im Rohextrakt durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

abgetrennt. Anfänglich wurden konventionelle Ausschwingrotoren (Beckman SW 27.1) mit linearen Saccharosegradienten (10-30% w/v) verwendet. Um eine gute Trennung des Kopplungsfaktors von der Carboxylase zu erreichen, musste bei 20°C während zwanzig Stunden bei 25'000 rpm (Beckman Spinco L2-65) zentrifugiert werden. Aus der Notwendigkeit einer möglichst schnellen Reinigung heraus wurde später die lange Zentrifugation im Ausschwingrotor ersetzt durch eine kürzere Methode. Die konzentrierten Rohextrakte (1.0ml mit maximal 8mg Protein) wurden auf einen linearen Gradienten (10-25% w/v, total 36ml) überschichtet und in einem Festwinkelrotor (Beckman Ti 60) während 150 Minuten bei 55'000rpm und 20°C zentrifugiert. Das Beschleunigen des Rotors wurde bis zu einer Umlaufzahl von 2000 rpm so langsam wie möglich (etwa drei Minuten) von Hand gesteuert und beim Abbremsen des Rotors wurde bei 4000 rpm die Bremse ausgeschaltet, so dass das Umschichten des Gradienten von der Horizontalen in die Vertikale und zurück möglichst schonend erfolgen konnte.

2.2. EXPERIMENTE

2.2.1. Steady-state-Phosphorylierung

Der Ansatz diente einerseits zur Ermittlung der Phosphorylierungsaktivität der Chloroplastenfragmente und andererseits als Vorinkubation der Membranen zur Markierung der festgebundenen Adeninnukleotide. Die Chloroplastenmembranen wurden in folgenden Medium inkubiert: 0.025M Tricine-NaOH pH 8.0, 10mM NaCl,

5mM MgCl_2 , 1mg/ml BSA, 1mM Na-Ascorbat, 0.05mM PMS, 2mM ADP und 1mM Na_2HPO_4 . In einigen Ansätzen wurde $8\text{-}^{14}\text{C}$ -ADP oder $U\text{-}^{14}\text{C}$ -ADP sowie ^{32}P - Na_2HPO_4 als radioaktive Markierung eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 200 ml und die Chlorophyllkonzentration 0.5 bis 1.0 mg/ml. Somit konnten pro Ansatz maximal 200mg Chlorophyll verarbeitet werden. Die Inkubation erfolgte bei 25°C (Wasserbad) in einem zylindrischen Gefäss und wurde mittels Magnetrührer gut durchmischt. Belichtet wurde während 60 Sekunden mit drei Glühlampen (Philips Comptalux 300 W), was einer Lichtintensität von $1.95 \times 10^5 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$ im Gefäss entspricht (KIPP&ZONEN Solarimeter Typ CM 5). Gestoppt wurde die Reaktion entweder durch Zugabe von PCA (Endkonzentration 0.5M) für die Bestimmung der Phosphorylierungsaktivität oder durch rasches Abtrennen der Membranen vom Medium im Dunkeln und bei 4°C durch Zentrifugation im Falle der Markierungsexperimente. In einigen Experimenten wurde die Reaktion auch durch Zugabe des Entkopplers CCCP (10^{-5}M) abgestoppt. Zur Bestimmung der Phosphorylierungsaktivität wurden die denaturierten Membranen abzentrifugiert (10 Minuten bei 5000g) und das in Adeninnukleotide eingebaute ^{32}P nach der in Kapitel 2.5. erwähnten Methode bestimmt.

2.2.2. Phosphorylierung ohne exogene Nukleotide

Zur Abklärung der Frage, wie sich die während der Chloroplasten-Präparation an den Membranen verbleibenden Adeninnukleotide (praktisch ausschliesslich festgebundene Nukleotide) unter

phosphorylierenden Bedingungen verhalten, wurde die Phosphorylierung ohne zusätzliches ADP gemessen. Die Inkubationsbedingungen waren sonst gleich wie unter 2.2.1.

2.2.3. Austauschmarkierung

Für die radioaktive Markierung der festgebundenen Adenin-nukleotide wurde in Anlehnung an Strotman et al (25) folgendes System verwendet: Die Chloroplastenfragmente wurden im Inkubationspuffer (0.025M Tricine-NaOH pH 8.0, 50mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0.5mM Methylviologen oder 0.05mM PMS, 0.02mM ¹⁴C-ADP bei einer Chlorophyllkonzentration von 1mg/ml aufgenommen und analog der Phosphorylierung während 60 Sekunden belichtet. Durch anschliessende Zentrifugation (2-3 Minuten bei 20'000g) wurden die Membranen sofort vom Medium abgetrennt.

2.2.4. Entfernen der freien Nukleotide von Membranen

Nach erfolgter Inkubation und Abtrennung vom Medium wurden die Partikel zwei- bis dreimal gewaschen in 0.025M Tricine-Puffer pH 7.8, 50mM NaCl. Nach weiteren zwei Waschschritten mit 10mM NaPP₃-Lösung pH 7.4 waren die Membranen vorbereitet für die Isolierung des Kopplungsfaktors. Alle Waschschrritte wurden bei 4°C und in absoluter Dunkelheit ausgeführt.

2.2.5. Trennung des Kopplungsfaktors von stabilisierendem ATP

Der von der Membran abgelöste Kopplungsfaktor CF₁ wurde in einigen Fällen durch zugegebenes ATP 1mM stabilisiert. Vor der

Extraktion der festgebundenen Adeninukleotide aus dem reinen CF_1 wurden deshalb die freien, stabilisierenden Nukleotide durch Gelfiltration über Sephadex G-50 (Säule 1.2 x 25 cm, aequilibriert mit 10mM Tricine-NaOH pH 7.8 , 2mM EDTA) abgetrennt.

2.3. EXTRAKTION DER FESTGEBUNDENEN NUKLEOTIDE

Zur Bestimmung des totalen (^{14}C)-Adennukleotidgehaltes an ganzen Membranen wurden drei verschiedene Methoden miteinander verglichen:

a) direkte Messung: Teile der gewaschenen Chloroplastensuspension wurden direkt in Scintillationsmedium (Zusammensetzung siehe Kapitel 3.5.6.) pipettiert und die Radioaktivität gemessen. Anhand einer Chlorophyll-Quenchkurve konnten die gemessenen Werte korrigiert werden.

b) Hitzeablösung: Ein Aliquot (5ul) der gewaschenen Thylakoid-Suspension wurde im Dunkeln zu 45ul Extraktionspuffer gegeben: 5mM Tricine-NaOH pH 8.2 , 50mM NaCl, 5mM $MgCl_2$, 2mM ADP und 2mM KH_2PO_4 -Puffer pH 8.0). Die total 50ul wurden in eine Micropipette (Gilson) aufgenommen und rasch zu 50ul 0.1M Tricine-Puffer pH 8.0 zugegeben. Der Ansatz wurde anschliessend in einem kochendem Wasserbad während einer Minute belassen, abzentrifugiert und aus dem klaren Ueberstand die Radioaktivität und die Zusammensetzung (HPLC) bestimmt.

c) Solubilisierung mit PCA+SDS: Eine von Pflugshaupt und Bachofen (31) entwickelte Methode wurde leicht abgeändert: Gewaschene

Chloroplastenmembranen wurden in SDS (2%) und PCA (5%) aufgelöst und die Radioaktivität gemessen (Details siehe Ref. 31)

Zur Analyse der festgebundenen Nukleotide am isolierten und gereinigten Kopplungsfaktor wurde der Protein-Nukleotid-Komplex durch Zugabe von eiskalter PCA (Endkonzentration 4%) ausgefällt und der Niederschlag abzentrifugiert (10 Minuten 5000 g).

Die totale Radioaktivität konnte direkt aus einem Teil des Ueberstandes bestimmt werden; die Analyse der Nukleotidverteilung erfolgte durch HPLC.

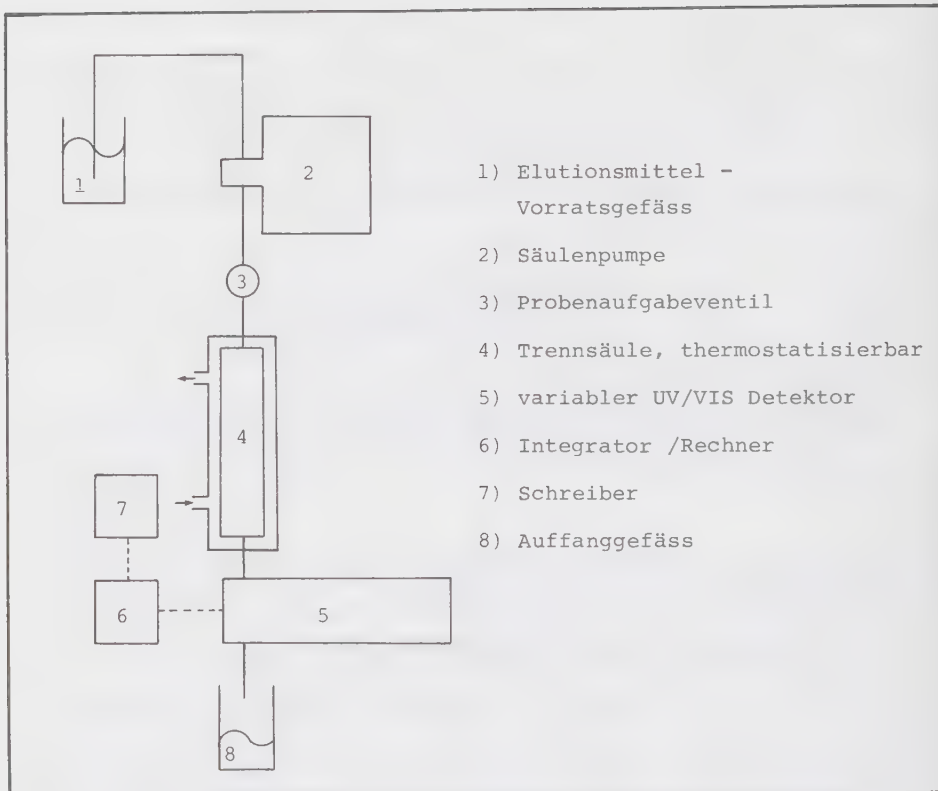
2.4. ANALYSE DES NUKLEOTID-EXTRAKTES

2.4.1. Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Zur quantitativen Analyse der vom Kopplungsfaktor extrahierten Nukleotide wurde eine Methode ausgearbeitet, welche bei sehr hoher Empfindlichkeit und in relativ kurzer Zeit sehr gute Resultate lieferte.

Die Auftrennung des Extraktes konnte ohne Gradientenelution in etwa fünfzehn Minuten erreicht werden; die Erkennung der einzelnen Komponenten im Extrakt erfolgte durch Messen der Absorption im ultravioletten Bereich in einem hochempfindlichen UV-Spektralphotometer, an welchem ein Schreiber und ein Integrator zur Quantifizierung angeschlossen waren.

Figur 2 zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten Apparatur.



Figur 2: HPLC-SYSTEM (Erläuterungen im Text)

Die Probe wird entweder in eine Probenschleife (25ul/100ul oder 250ul Volumen) gegeben und gelangt über ein Probenaufgäbeventil (Altex) im Durchfluss auf die Säule oder mit einer Hamilton-Präzisionsspritze durch ein Gummiseptum des Injektionsventils eingespritzt.

Der entgaste Elutionspuffer ($0.4\text{M } (\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ pH 3.5) wird mit der Säulenpumpe (Altex 110) durch die Trennsäule gepumpt.

Die durch einen Wassermantel thermostatisierbare Trennsäule aus rostfreiem Stahl (Innendurchmesser 4.5mm, Länge 250mm) ist vollständig gefüllt mit dem Trennmaterial. Die besten Resultate wurden mit einen kleinen (Partikelgrösse 10 μ), nicht verformbaren und durch-und-durch porösen stark basischen Anionentauscher erreicht (Nucleosil 10SB, Macherey-Nagel & Co.). Er besteht aus einem SiO₂-Gerüst, an dessen Oberfläche die wirksamen quaternären Ammoniumgruppen -N⁺(CH₃)₃Cl⁻ gebunden sind. Die Austauschkapazität beträgt etwa 1mval/g. Die UV-Absorption des Säuleneluates wird unmittelbar nach der Säule im UV/Vis-Spektralphotometer (Uvikon LCD 725) bei 257nm gemessen. Das Volumen der brechungsindexfreien Durchflusssküvette beträgt 8 μ l bei einer Länge von 10mm. Der angeschlossene Integrator (Spectra-Physics Minigrator) speichert die Werte und intergriert das Elutionsprofil nach vorgegebenen Parametern. Die Trennung wird auf einem Schreiber (W+W 1100) kontrolliert.

Probenvorbereitung

Der Vorbereitung der Probe kommt in einer derart empfindlichen Analysenmethode eine wichtige Bedeutung zu. Normalerweise wurde der Protein-Nukleotid-Komplex durch HClO₄ (4%) denaturiert, das Protein abzentrifugiert und im verbleibenden sauren Ueberstand die Nukleotide bestimmt. Weil aber die Säure die nachfolgende chromatographische Analyse stört, musste sie entfernt werden. Eine der verwendeten Methoden bestand in der Neutralisation durch Zugabe von K₂CO₃ und abzentrifugieren des entstandenen, schwerlöslichen KClO₄, wobei aber immer Restmengen von Perchlorationen übrigblieben und die Trennung

durch HPLC beeinträchtigten. Auch lieferte diese Methode nicht ausreichend reproduzierbare Resultate, weshalb ein anderes Verfahren gesucht wurde. Dabei wird die saure Lösung durch Zugabe eines wasserunlöslichen Amins (Tricaprylyl tertiäres Amin, Handelsname Alamine 336, General Mills Chemicals, Minneapolis USA) neutralisiert, wobei das Alamine 336 gelöst ist in einem wasserunlöslichen organischen Lösungsmittel (Freon-TF, Du Pont). Zu einem Volumenteil PCA-Extrakt wurde ein Volumenteil frisch angemachte Alamine/Freon-Lösung gegeben (0.5Mol Alamine pro Liter Freon). Der Ansatz wurde während drei bis vier Minuten in einem verschlossenen Zentrifugenglas vorsichtig auf einem Vortex-Mischer durchmischt. Durch anschliessende Zentrifugation (10 Minuten 500 g) wurden die Phasen getrennt. Es entstanden zwei gut getrennte organische Phasen , welche klar separiert waren von einer oben aufliegenden Wasserphase mit einem pH-Wert zwischen vier und fünf. Wie die Vorversuche zeigten, waren die Nukleotide quantitativ in der Wasserphase verblieben, von welcher Aliquote direkt auf die Trennsäule aufgetragen wurden.

Auswertung

Die Identifizierung der einzelnen Fraktionen im Nukleotid-Extrakt wurde durch Vergleich mit Markernukleotiden entweder als externer oder interner Standard vorgenommen. Retentionszeit und Retentionsvolumen sind unter konstanten analytischen Bedingungen charakteristisch für eine bestimmte Komponente. Die quantitative Auswertung geschah nach zwei Methoden: direkte Integration der Peakflächen und Mengenbestimmung durch externen oder internen Standard im Integrator oder Handauswertung des Schreiberprofils.

2.4.2. Enzymatische Nukleotidbestimmung

Zusätzlich zur Bestimmung mit HPLC wurde der Gehalt an Adeninnukleotiden (AMP und ADP) in den Extrakten mit einer von Jaworek et al. (41) ausgearbeiteten Methode bestimmt.

Die enzymatische Analyse (mit Myokinase EC 2.7.4.3., Pyruvatkinase EC 2.7.1.40 und Lactat-Dehydrogenase EC 1.1.1.27) erlaubt eine rasche und einfache Bestimmung von AMP und ADP in einer Zweistufenreaktion im gleichen Ansatz.

Gemessen wurde die Abnahme von NADH, welche proportional ist zu den Mengen AMP oder ADP, anhand der UV-Absorption bei 340nm in einem Shimadzu-Spektralphotometer 210 A.

2.5. ANALYTISCHE METHODEN

2.5.1. Chlorophyllbestimmung

Die Chlorophyllbestimmung der Chloroplasten-Suspensionen wurde nach der Methode von Arnon (32) durchgeführt (Absorption des Aceton-Extraktes bei 652nm).

2.5.2. Proteinbestimmungen

Anfänglich wurde die Methode von Lowry et al (33) mit Rinderserumalbumin als Referenzprotein verwendet. Wegen der Anfälligkeit dieser Methode (zum Beispiel auf Tris-Puffer) wurden die Proteinbestimmungen später nach der Methode von Bensadoun und Weinstein (34) durchgeführt.

2.5.3. ATPase-Aktivität

Die Ca^{++} -abhängige ATPase-Aktivität des isolierten Kopplungs-faktors wurde wie folgt bestimmt:

Die Aktivierung der latenten ATPase erfolgte nach Lien und Racker (26) durch Trypsin-Behandlung. Die aktivierte ATPase wurde anschliessend während zehn Minuten bei 37°C inkubiert: 0.05M Tris-HCl pH 9.0, 0.1mg/ml BSA, 5mM CaCl_2 , 5mM ATP p.a. Das aus ATP freigesetzte anorganische Phosphat wurde nach Säureabstoppen mit der von Taussky und Schorr (35) beschriebenen Methode colorimetrisch bestimmt.

2.5.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die PAGE unter nicht denaturierenden Bedingungen wurde nach der Methode von Davis (36) durchgeführt. Die Proteine wurden nach Auftrennung durch Färbung mit Coomassie brilliant blue (0.05% in 50% Methanol und 5% Essigsäure, 30 Minuten bei 60°C)

und nachfolgender Entfärbung der Gele über Nacht in 10% Methanol und 10% Essigsäure nachgewiesen.

Die ATPase-Aktivität des Proteins im Gel konnte durch eine Modifikation der von Gomori (37) ausgearbeiteten Methode für die Bestimmung der Phosphatase-Aktivität in Geweben aufgezeigt werden. Dazu wurde das Gel während fünfzehn Minuten bei 30°C in der für den ATPase-Ansatz beschriebenen Art inkubiert. Nach dem Wegwaschen des Reaktionsmediums mit destilliertem Wasser wurde das im Gel freigewordene anorganische Phosphat durch Inkubation in 80mM Tris-Maleat pH 7.0 und $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (30 Minuten bei 37°C) in $\text{Pb}(\text{PO}_4)_2$ überführt. Durch Einlegen des Gels in $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ entstand aus dem $\text{Pb}(\text{PO}_4)_2$ das unlösliche PbS . Die Proteinbande mit ATPase-Aktivität wurde durch eine schwarze Bande vor hellbraunem Hintergrund angezeigt.

PAGE in Gegenwart von SDS wurde entsprechend der von Laemmli (38) beschriebenen Methode in leicht abgewandelter Form durchgeführt. Es wurden Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 12.5% und einer SDS-Konzentration von 0.1% verwendet.

2.5.5. Bestimmung des total veresterten Phosphats

Aus einem Milliliter des Ueberstandes nach der Fällung der Proteine wurde nach der von Avron (39) beschriebenen Methode das total veresterte Phosphat bestimmt. Dabei wird das anorganische Phosphat $^{32}\text{P}_a$ als Phosphomolybdänsäurekomplex mit Isobutanol/Benzol zweimal extrahiert. Von der wässrigen Phase wurden je 1ml in ein Scintillationsgefäß mit neun Milliliter Wasser überführt und die Radioaktivität durch Messen der Cerenkovstrahlung gemessen.

2.5.6. Radioaktivitätsmessungen

Proben, welche nur Phosphor-32 enthielten, wurden aufgrund der Cerenkov-Strahlung (40) in wässrigem Milieu in einem Scintillationszähler (Nuclear Chicago Isocap 300, Kanal 1) gemessen.

Das Scintillationsmedium für die 14-C-markierten Proben bestand aus den Scintillatoren 2.5-Diphenyloxazol und 1.4bis-(2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl))-Benzol, welche in Toluol und Aethanol gelöst wurden. Gezählt wurde ebenfalls in einem Nuclear Chicago Isocap 300 Scintillationszähler auf Kanal 5. Bei doppelt markierten Proben (32-P und 14-C) wurden die Resultate auf den Anteil von 32-P im Scintillationsmedium auf Kanal 5 respektive den Anteil von 14-C in wässrigem Milieu auf Kanal 1 korrigiert.

2.6. CHEMIKALIEN

Adenosin, AMP, ADP und ATP wurden bei Boehringer, Mannheim bezogen, wo auch die verwendeten Enzyme gekauft wurden.

Coomassie brilliant blue R 250 lieferte Merck, Darmstadt.

32-P als Orthophosphat in verdünnter HCl-Lösung, 8-¹⁴C-ADP und U-¹⁴C-ADP wurden vom Radiochemical Center Amersham bezogen.

Die für die Polyacrylamidgelelektrophorese verwendeten Chemikalien waren Produkte von Serva Feinbiochemica, Heidelberg.

Alle nicht speziell erwähnten Chemikalien waren analysenrein.

3. VORVERSUCHE

EINLEITUNG

Mit Vorversuchen sollten die experimentellen Bedingungen für die nachfolgenden Hauptversuche abgeklärt werden. Durch Veränderung einzelner Parameter sollten die sich anbietenden, bestehenden Methoden auf die spezielle Problemstellung optimiert oder neue Methoden ausgearbeitet werden.

Ausgehend von einem System zur Bestimmung der Phosphorylierungsaktivität von Spinatchloroplasten (41), das für sehr kleine Mengen an Membranen (1mg Chlorophyll) vorhanden war, musste ein Ansatz gefunden werden, mit welchem unter möglichst gleichen Bedingungen sehr viel mehr Membranen (200mg Chlorophyll) eingesetzt werden konnten. Angeregt durch Experimente von Strotmann et al. (25) wurde abgeklärt, wieweit sich membran-gebundene Nukleotide austauschen lassen gegen freie, radioaktiv markierte Nukleotide, um so einerseits mit einfachen Mitteln eine Markierung zu erreichen und andererseits die Austauschreaktion (als Teilschritt der Phosphorylierung) mit der steady-state Phosphorylierung vergleichen zu können.

Weiter musste untersucht werden, wie sich freie und nicht spezifisch gebundene Nukleotide aus den vorinkubierten Membranen einfach und schnell entfernen lassen, um überhaupt die festgebundenen Nukleotide untersuchen zu können. Ebenso wurden verschiedene Methoden zur Extraktion der festgebundenen Nukleotide miteinander verglichen und die Stabilität der Nukleotide untersucht. Schliesslich galt es eine Methode auszuarbeiten, um die nicht radioaktiv markierten Nukleotide in sehr kleinen

3.1. STEADY-STATE-PHOSPHORYLIERUNG UND AUSTAUSCHREAKTION

PHOSPHORYLIERUNG

Chloroplastenfragmente wurden im Phosphorylierungsmedium mit limitierender Phosphatkonzentration bei einer Chlorophyllkonzentration von 1mg/ml inkubiert. In Intervallen von zehn Sekunden nach Einschalten des Lichtes wurden Proben entnommen, mit Perchlorsäure ausgefällt und die Phosphorylierungsaktivität bestimmt.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, nimmt die Phosphorylierungsrate über einen Zeitraum von einer Minute nur geringfügig ab und ist auch nach sechzig Sekunden noch relativ hoch.

Inkubationszeit	Phosphorylierungsaktivität (uMol verestertes P/mg Chlorophyll.h)
Licht 10 Sekunden	593
Licht 20 Sekunden	511
Licht 30 Sekunden	445
Licht 40 Sekunden	439
Licht 50 Sekunden	437
Licht 60 Sekunden	431

Tabelle 1: Phosphorylierungsrate in Abhängigkeit der Belichtungszeit: Die Chloroplastenmembranen (1mg Chl/ml) wurden in total 200ml Reaktionsmedium inkubiert (0.025M Tricine-OH pH 8.0, 10mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mg/ml BSA, 1mM Na-Ascorbat, 0.05mM PMS, 2mM ADP, 1mM Na₂HPO₄).

Damit konnte gezeigt werden, dass sich im verwendeten System grosse Mengen Chloroplastenmembranen unter guten phosphorylierenden Bedingungen inkubieren lassen.

Durch Vergleich der Gesamtmenge extrahierbarer, membran-gebundener Nukleotide (bestimmt durch HPLC) mit den während der Photophosphorylierung mit $^{32}\text{-P}$ radioaktiv markierten Adennukleotiden zeigte sich, dass nur ein geringer Teil der Gesamtnukleotide markiert wird (unter 2%). Der relativ kleine Anteil an markierten Nukleotiden kann durch Annahme eines sehr unvollständigen Gleichgewichtes zwischen zugegebenem $^{32}\text{-P}_a$ und dem gebundenen, nicht markierten, anorganischen Phosphat teilweise erklärt werden. Ferner wurde mit Chloroplastenmembranen gezeigt (42), dass jeweils nur etwa 10 bis 20% der Kopplungsfaktoren aktiv sind. Wieweit diese Anzahl den ursprünglichen Bedingungen entspricht oder durch teilweise Inaktivierung von Kopplungsfaktoren während der Chloroplasten-Isolierung zuzuschreiben ist, bleibt offen.

AUSTAUSCHMARKIERUNG

Durch dreimaliges Waschen der Chloroplastenfragmente mit hypotonischer Salzlösung geht die Adenylatkinase-Aktivität praktisch vollständig verloren (43), während der Kopplungsfaktor an den Thylakoidmembranen gebunden und die Phosphorylierungsaktivität grösstenteils erhalten bleibt. Wenn gewaschene Chloroplasten im Licht und in Anwesenheit von $^{14}\text{C-ADP}$ inkubiert werden, wird der $^{14}\text{C-ADP}$ -Label in die Membran eingebaut. Ein beträchtlicher Teil dieser Markierung lässt sich durch anschliessendes Waschen der Chloroplasten im Dunkeln nicht mehr entfernen (siehe 3.2.), was auf eine starke Interaktion zwischen Nukleotiden und Membran schliessen lässt.

Tabelle 2 zeigt eine solche Austauschmarkierung unter nicht phosphorylierenden Bedingungen (kein exogenes anorganisches Phosphat und sehr tiefe Konzentration an zugegebenem ADP).

Inkubation	Gehalt an ^{14}C -Adeninnukleotiden	
	Chloroplasten (nMol/mg Chlorophyll)	Kopplungsfaktor * Mol/Mol
Dunkel	0.02	0.02
Licht 60 Sekunden	0.71	0.55

Tabelle 2: Einbau von ^{14}C -ADP in Chloroplasten:

Dreimal gewaschene Chloroplasten wurden inkubiert in:
 0.025mM Tricine-OH pH 8.0, 50mM NaCl, 5mM MgCl_2 ,
 0.5 mM Methylviologen, 0.02mM ^{14}C -ADP.

Chlorophyllkonzentration: 1mg/ml.

Die Werte wurden bestimmt nach dreimaligem Waschen nach der Inkubation (siehe 3.2.).

* gerechnet unter Annahme eines Verhältnisses
 Kopplungsfaktor/Chlorophyll von 1/860 (30).

Aus diesen Membranen wurde nach Wegwaschen der unspezifischen Markierung der Kopplungsfaktor als Rohextrakt isoliert und der Gehalt an ^{14}C -Adeninnukleotiden bestimmt (Tabelle 3).

	^{14}C -AdN nMol/mg Protein	^{14}C -AdN Mol/Mol CF_1 *
aus dunkel vorbe- handelten Membranen	0.06	0.03
aus lichtinkubierten Membranen	1.23	0.60

Tabelle 3: Gehalt an ^{14}C -Adeninnukleotiden (AdN) im Rohextrakt.

* Molekulargewicht des Kopplungsfaktors: 326000 (44)
 Reinheit im Rohextrakt 60%

Aus den Tabellen 2 und 3 kann geschlossen werden, dass der Einbau von ^{14}C -ADP in Chloroplastenmembranen durch Austausch im Licht spezifisch an den Kopplungsfaktor stattfindet und dass der gebildete Protein-Nukleotid-Komplex erhalten bleibt während der Extraktion im Dunkeln und bei 4°C .

3.2. WEGWASCHEN VON FREIEN NUKLEOTIDEN

Um nur die festgebundenen Nukleotide analysieren zu können mussten die Membranen nach der Inkubation - Phosphorylierung oder Austausch - vom Reaktionsmedium befreit und die unspezifisch gebundenen Nukleotide gewegewaschen werden.

Tabelle 4 zeigt, dass nach viermaligem Waschen praktisch keine Radioaktivität mehr von den Membranen entfernt werden kann. Der Gehalt an gebundenen ^{14}C -Adeninnukleotiden schwankte zwischen 0.5 und 1.2nMol/mg Chlorophyll.

Anzahl Waschschrirte	cpm ^{14}C im Ueberstand nach Zentrifugation
1	7.51×10^7
2	1.23×10^7
3	2.88×10^6
4	1.39×10^6
5	0.21×10^6
6	0.19×10^6

Tabelle 4: Waschen der inkubierten Membranen von freien und unspezifisch gebundenen Adeninukleotiden.

Waschpuffer: 0.025M Tricine-OH pH 7.8, 50mM NaCl.

Total eingesetzte Radioaktivität: 9.38×10^7 cpm.

3.3. EXTRAKTION DER FESTGEBUNDENEN ADENINNUKLEOTIDE

Aus ganzen Membranen

Die Extraktion der festgebundenen Nukleotide aus ganzen Membranen ist wesentlich schwieriger als das Ablösen von der isolierten ATPase und konnte noch nirgends befriedigend erreicht werden. In den meisten Arbeiten zum Verhalten der Nukleotide während der Phosphorylierung werden die Reaktionen durch Säurezugabe gestoppt und die dadurch abgelösten Nukleotide zusammen mit den freien Nukleotiden analysiert. Für eine quantitative Analyse, vor allem in bezug auf das Verteilungsmuster zwischen AMP, ADP und ATP, ist es jedoch entscheidend, dass während der Extraktion keine Veränderung eben dieser Nukleotidzusammensetzung erfolgt. Magnusson und McCarty (45) konnten jedoch zeigen, dass gerade durch Säurebehandlung der Chloroplastenmembranen bei der Ablösung der Nukleotide aus gebundenem ADP zusätzliches ATP gebildet und damit die Analyse verfälscht wird. Demgegenüber wollen Vinkler et al (46) keine solche zusätzliche 'ATP-Synthese' gefunden haben. Da aber für die vorliegenden Untersuchungen die Nukleotide nicht direkt an ganzen Membranen bestimmt wurden, sondern erst nach Isolierung des Kopplungsfaktor-Nukleotidkomplexes, wurde auf diese Probleme nicht näher eingegangen.

Zur Bestimmung des totalen ^{14}C -Adeninnukleotidgehaltes ganzer Membranen nach Photophosphorylierung oder Austauschmarkierung wurden drei Methoden miteinander verglichen: direkte Messung, Hitzeablösung und Solubilisierung der Membranen durch SDS+PCA. In Tabelle 5 sind die Resultate einander gegenübergestellt.

Extraktionsverfahren (Details siehe 2.3.)	total bestimmte ^{14}C -AdN	
	$\mu\text{Mol/Mol Chlorophyll}$	AdN/CF_1
direkte Messung	105	0.90
Hitzeablösung	100	0.86
SDS + PCA	96	0.83

Tabelle 5: Extrahierbare Adeninnukleotide (AdN) aus Chloroplasten nach Markierung mit ^{14}C -ADP.

Die Extraktionsmethoden sind im Kapitel 2.3. näher beschrieben.

Die Resultate zeigen, dass alle drei Methoden zur Bestimmung des totalen ^{14}C -Adeninnukleotid-Einbaus in Membranen geeignet sind. Normalerweise wurde wegen ihrer einfachen Anwendung und reproduzierbaren Resultaten die Hitzeablösung angewendet.

Aus dem isolierten Kopplungsfaktor

Bestimmung und Charakterisierung festgebundener Nukleotide erfordern Ablösung vom Protein. Ueblicherweise wird das Protein denaturiert durch Perchlorsäure oder Trichloressigsäure, Hitzeeinwirkung oder Harnstoffbehandlung. Dabei muss eine vollständige Denaturierung - und damit vollständige Ablösung der Nukleotide - gewährleistet sein, ohne jedoch deren Gehalt oder Zusammensetzung zu verändern. Bei der Fällung durch Perchlorsäure und Neutralisation des sauren Extraktes durch KOH oder K_2CO_3 bestehen folgende Fehlermöglichkeiten in der Analyse: - Nukleotide können bei tiefen Konzentrationen mit dem gebildeten KClO_4 präzipitieren und gehen dabei verloren und - im neutralisierten Extrakt vorhandene aktive Adenylatkinase kann einen Phosphattransfer verursachen.

Diese Fehlermöglichkeiten wurden in Vorversuchen untersucht, die Resultate sind in den Tabellen 6 und 7 zusammengestellt. Chloroplasten wurden mit ^{14}C -ADP beladen (Kapitel 3.1.) und daraus ein CF_1 -Rohextrakt isoliert (Methode Kapitel 2.1.3.). Die totale Radioaktivität des gelösten Protein-Nukleotid-Komplexes wurde gemessen. Durch Zugabe von Perchlorsäure wurde das Protein denaturiert und der Ueberstand nach der im Kapitel 2.4.1. beschriebenen Methode neutralisiert. Aus Tabelle 6 geht hervor, dass 96% der eingesetzten, ursprünglich am Protein gebundenen Radioaktivität im neutralisierten Extrakt wiedergefunden werden konnte. Es zeigte sich, dass diese Ausbeute abhängig ist von der Konzentration an Protein-Nukleotid-Komplex vor der Ausfällung: Für gute Ausbeuten sollte eine Nukleotid-Konzentration von $\ln\text{Mol/ml}$ nicht unterschritten werden.

	total cpm ^{14}C	Ausbeute
CF_1 -Rohextrakt	593400	100%
neutralisierter Extrakt	569660	96%

Tabelle 6: Ausbeute an Adeninnukleotiden nach PCA-Extraktion
Erläuterungen im Text.

Nach Literaturangaben (22) verhindert die Zugabe von EDTA (2mM) eventuell vorhandene Adenylatkinase-Aktivität.

3.4. STABILITÄT DER NUKLEOTIDE WÄHREND DER EXTRAKTION

Zur Abklärung der Frage, ob während der Extraktion und Neutralisation Veränderungen der Nukleotid-Zusammensetzung ablaufen oder nicht, wurde der folgende Versuch durchgeführt.

AMP, ADP und ATP in bekannten Mengen wurden in Tricine-Puffer 10mM, pH 7.7 bei einer Konzentration von je 0.02mM gelöst.

Zu dieser Nukleotidlösung wurden radioaktive Marker und BSA (1mg/ml) zugegeben. Das Protein wurde durch Perchlorsäure ausgefällt, die saure Lösung neutralisiert und im Nukleotidextrakt der Gehalt an AMP, ADP und ATP durch HPLC und die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen im Scintillationszähler bestimmt.

	HPLC-Analyse (in 250ul)			cpm ^{14}C ($\times 10^6$)		
	AMP	ADP	ATP	AMP	ADP	ATP
Ausgangslösung	5nMol	5nMol	5nMol	1,68	1,97	2,29
nach Extraktion und Neutralisation	4.85 nMol	4.80 nMol	4.80 nMol	1,63	1,89	2,18
% Ausbeute	97	96	96	97	96	95

Tabelle 7: Ausbeute von Markernukleotiden (AMP/ADP/ATP) nach Extraktion und Neutralisation.
Erläuterungen im Text.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass mit den verwendeten Extraktions- und Neutralisationsmethoden Verfahren verwendet wurden, welche in bezug auf Gesamtausbeute und Stabilität der Nukleotide gute Resultate ergaben.

3.5. NEUTRALISATION DES EXTRAKTES UND TRENNUNG DER NUKLEOTIDE

Neutralisation des Extraktes

Wegen den unter Kapitel 3.3. beschriebenen Fehlermöglichkeiten, welche bei einer Neutralisation des Perchlorsäure-Extraktes durch KOH oder K_2CO_3 auftreten können, wurde nach einer anderen Neutralisationsmethode gesucht. Neben dem quantitativen Entfernen der Säure sollte die Methode auch möglichst keinen störenden Effekt auf die nachfolgende Analyse des Extraktes durch HPLC aufweisen.

Schon seit längerer Zeit sind Verfahren bekannt, mit welchen Säuren in Extrakten durch Amine entfernt werden können. Die Amine sind jeweils gelöst in Lösungsmitteln, die sich möglichst nicht mit den wässrigen Extrakten mischen lassen. Eine von Rhym (47) veröffentlichte Methode wurde leicht abgeändert übernommen. Als Amin wurde das Alamine 336 (Tricaprylyl tertiäres Amin) aus folgenden Gründen gewählt: Es ist in sehr reiner Form erhältlich, praktisch wasserunlöslich und zeigt keine UV-absorbierenden Verunreinigungen, welche die Auswertung der HPLC-Chromatogramme beeinflussen könnten. Als Lösungsmittel wurde Freon-TF wegen seiner äusserst geringen Löslichkeit in Wasser (und umgekehrt) verwendet.

Trennung der Nukleotide mit HPLC

Nach einigen, sehr zeitraubenden Versuchen konnte ein System entwickelt werden, mit welchem sich die Adeninukleotide gradientenfrei und reproduzierbar auftrennen lassen.

Untersucht wurden vor allem die folgenden Punkte:

- Auswahl eines geeigneten Trennmateri als. Ausgetestet wurden AX-Corasil (Waters), AS-Pellionex SAX (Reeve Angel) und Nucleosil 10 SB (Macherey-Nagel). Am besten in bezug auf Permeabilität, Kapazität und Zahl der erreichten Trennstufen hat sich Nucleosil erwiesen.
- Einfluss der Temperatur. Sehr gute Resultate wurden bei Zimmertemperatur erhalten. Vielfach sind erhöhte Temperaturen bis 70°C für ähnliche Trennprobleme beschrieben, die jedoch keine Verbesserungen brachten. Durch das Arbeiten bei Raumtemperatur fallen auch die Probleme der thermischen Stabilität der Nukleotide weg.
- Einfluss der Ionenstärke und des pH-Wertes der mobilen Phase. Durch Verändern der Ionenstärke der mobilen Phase bei einer Ionenaustauscher-Chromatographie lässt sich die Konkurrenz von Lösungsmitteln- und Probenmolekülen um die funktionellen Gruppen am Trägermaterial beeinflussen. Durch Erhöhung der Ionenstärke des Lösungsmittels lässt sich die Elution beschleunigen und umgekehrt. Ein Verändern des pH-Wertes der mobilen Phase dagegen beeinflusst nur die Gleichgewichtseinstellung zwischen Probenmolekülen und den funktionellen Gruppen des Trägermaterials. So nimmt die Retention schwacher Säuren an einem Anionenaustauscher mit ansteigendem pH zu, da die Säure mehr in Ionen-Form vorliegt als bei niedrigem pH. Die besten Resultate wurden erreicht mit der mobilen Phase $(\text{NH})_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.4M und einem pH-Wert von 3.5.

Schwierigkeiten bereitete anfänglich der Uebergang von der Trennung bekannter Markernukleotide zur Analyse des biologischen Extraktes in bezug auf auftretende Störeffekte aus der Probenaufbereitung. Diese konnten jedoch durch die in Kapitel 3.3. und oben beschriebenen Methoden behoben werden. Die Trennsäulen wurden nach einer Nasspackmethode hergestellt, die verwendete Apparatur ist in Kapitel 2.4. beschrieben.

Figur 3: TRENNUNG VON AMP, ADP UND ATP DURCH HPLC

Elution: $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.4M pH 3.5

Flussrate: 1ml/min.

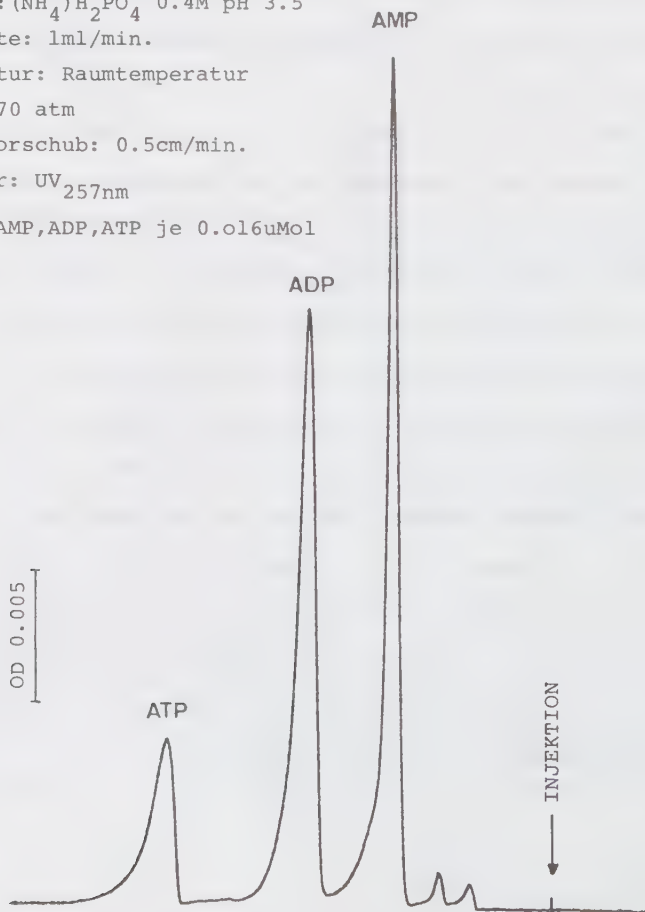
Temperatur: Raumtemperatur

Druck: 70 atm

Papiervorschub: 0.5cm/min.

Detektor: UV_{257nm}

Probe: AMP,ADP,ATP je 0.016μMol



4. HAUPTVERSUCHE

4.1. ISOLIERUNG UND REINIGUNG DES KOPPLUNGSFAKTORS (CF 1) AUS SPINATCHLOROPLASTEN

Mit vier verschiedenen Extraktions- und Reinigungsmethoden wurde der Spinat-Kopplungsfaktor isoliert und gereinigt. Ein Ablösen des Proteins von der Membran kann erreicht werden durch folgende Verfahren:

- a) Verdünnung der Chloroplasten-Suspension durch EDTA-Lösung bei niedriger Ionenstärke
- b) Behandlung einer wässrigen Chloroplasten-Suspension mit Chloroform
- c) Waschen der Chloroplastenmembranen mit hypertonischer Saccharose-Lösung
- d) Präzipitation mit Aceton

Untersucht wurden die Methoden a, b und c. Werden Chloroplasten mit EDTA inkubiert und die Partikel vom Ueberstand durch Zentrifugation getrennt, so verlieren diese die Fähigkeit der Photophosphorylierung und der Kopplungsfaktor geht in Lösung. Dabei ist eine eigentümliche Abhängigkeit des Entkopplungsgrades der Chloroplastenfragmente von der EDTA-Konzentration festzustellen (48); die maximale Entkopplung - und damit Solubilisierung des Kopplungsfaktors - wird erreicht bei einer EDTA-Konzentration von 0.75 bis 1mM und einer Chlorophyllkonzentration von 0.1mg/ml. Diese Extraktion wurde für die Reinigungsmethoden 1 und 2 (Tab.7) verwendet. Der Methode 3 liegt eine Extraktion durch Chloroform zugrunde; dabei löst sich der Kopplungsfaktor als fast einziges Protein in der wässrigen Phase.

Reinigungsstufe	Totalprotein (mg)	spez. Aktivität ($\mu\text{Mol ATP/mg} \cdot \text{min}$)	Totalaktivität ($\mu\text{Mol ATP/min}$)
<u>Methode 1</u>			
Rohextrakt aus			
200mg Chlorophyll	157	11	1727
1.DEAE-Sephadex	60.6	24	1454
2.DEAE-Sephadex	36.8	33	1214
<u>Methode 2</u>			
EDTA-Cellulose-			
Extrakt	55.5	14	777
Saccharose-Gradient	24.8	29	719
<u>Methode 3</u>			
Rohextrakt	69.0	15	1035
Saccharose-Gradient	32.2	22	708
<u>Methode 4</u>			
Rohextrakt	30.6	21	643
Saccharose-Gradient	23.2	26	603

Tabelle 7: REINIGUNG DES KOPPLUNGSFAKTORS CF_1 MIT VERSCHIEDENEN

METHODEN: 1) nach Lien und Racker (26)

2) nach Binder (27), verändert

3) nach Younis et al (29), verändert

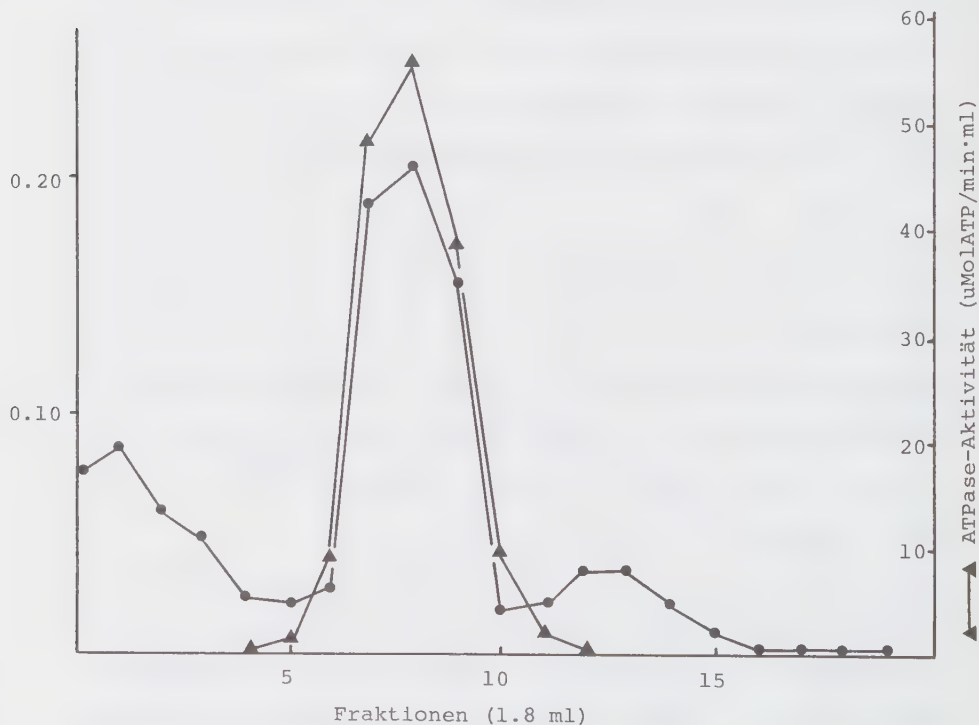
4) nach Strotmann et al (30), verändert

Ebenfalls fast reiner Kopplungsfaktor kann durch Waschen von Chloroplastenmembranen mit Saccharose-Lösung 300mM erhalten werden, wenn vorher die Ribulose-1,5-diPhosphat-Carboxylase selektiv aus den Membranen entfernt wurde. Diese Extraktion wurde in Methode 4 verwendet. Tabelle 7 gibt einen Ueberblick über die untersuchten Extraktionsmethoden und die erzielte Reinigung, die genauen Details sind Kapitel 2.1.3. zu entnehmen.

Mit Ausnahme der ersten Methode wurden alle Rohextrakte nach Konzentrierung durch Ultrafiltration oder Fraktionierung mit Ammoniumsulfat direkt über einen Saccharose-Dichtegradienten gereinigt. Obwohl durch die Reinigung über zwei Ionenaustauschersäulen (Methode 1) die beste Präparation mit der höchsten spezifischen ATPase-Aktivität erhalten werden konnte, wurden die anderen Verfahren vorgezogen. Die Ablösung durch EDTA bei tiefer Chlorophyllkonzentration hat zur Folge, dass grosse Volumen an Chloroplasten-Suspensionen abzentrifugiert und damit viel Ueberstand auf DEAE-Sephadex-A 50 Säulen aufgetragen werden müssen. Sowohl das Auftragen der Probe wie auch die Elution konnte nur bei kleinen Flussraten geschehen und dies hatte eine lange Reinigungszeit zur Folge. Gerade die totale Isolierungs- und Reinigungszeit sollte für die gewählte Problemstellung aber möglichst kurz sein, damit Rückschlüsse auf die Verhältnisse in der Membran überhaupt möglich sind. Aus diesen Gründen wurde die Präparationsmethode nach Lien und Racker fallen gelassen.

Von den restlichen drei Methoden führen besonders das Ablösen durch Chloroform (Nummer 3) und durch hypertonische Saccharose-Lösung (Nummer 4) sehr schnell zu relativ reinen Rohextrakten. Ueblicherweise wurde die Präparation durch Chloroformextraktion und Reinigung im Saccharosegradienten durchgeführt. Durch die Verwendung eines Festwinkelrotors anstelle von Ausschwingrotoren bei der Gradientenzentrifugation konnte die ganze Reinigungszeit -von der Auflösung der Chloroplasten bis zum reinen Kopplungsfaktor- wesentlich verkürzt werden. Sie betrug im besten Falle etwa sieben Stunden.

Die Darstellung in Figur 5 zeigt eine typische Reinigung der ATPase im Saccharosegradienten bei Verwendung eines Festwinkelrotors. Bei Verwendung eines Ausschwingrotors konnte keine wesentlich bessere Reinigung erreicht werden, die Zentrifugationszeit war aber mit zwanzig Stunden rund achtmal länger.



Figur 4: REINIGUNG AUF SACCHAROSE-GRADIENT

Saccharosegradient 10-25% w/v, 36ml Volumen

9mg Rohextrakt in 1.0ml aufgetragen

150 Minuten bei 55'000rpm Ti 60(Beckman), 20°C

Ausserdem konnten im Festwinkelrotor pro Zentrifugationslauf jeweils acht Gradiententrennungen durchgeführt werden, im Ausschwingrotor jedoch nur deren drei.

Der hohe Reinheitsgrad des isolierten Kopplungsfaktors (>95%) geht hervor einerseits aus der hohen spezifischen ATPase-Aktivität (Tabelle 7) und andererseits aus der elektrophoretischen Analyse sowohl des nativen wie auch des SDS-denaturierten Proteins (Figur 5).



Figur 5: POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE

Gele Nummer 1 und 2: Acrylamid 7.5% nach Davis (36)

1) Coomassie brilliant blue - Färbung des Proteins

2) PbS-Fällung (ATPase-Aktivität)

Gele Nummer 3 und 4: Acrylamid 12.5% nach Laemmli (38)

3) Rohextrakt (Gradientenauftrag) 56ug

4) vereinigte Kopplungsfaktor-Fraktionen 8lug

Aus den beiden Gelen des nativen Proteins (Nummer 1 und 2) geht hervor, dass die Aktivitätsbande der ATPase genau der Proteinbande entspricht. Aus den Gelen unter denaturierenden Bedingungen (Nummer 3 und 4) ist ersichtlich, dass im Saccharosegradienten neben wenig kleinen Proteinen vor allem Restmengen an Ribulose-1,5diPhosphat-Carboxylase abgetrennt wurde. Deshalb erscheint die β -Bande in Gel Nummer 3 (Rohextrakt) intensiver als die α -Bande, was auf die gleiche Mobilität der β -Untereinheit des CF_1 und der grossen Untereinheit der Ribulose-1,5diPhosphat-Carboxylase zurückzuführen ist. Zusätzlich ist die kleine Untereinheit der Carboxylase unterhalb der ϵ -Untereinheit des Kopplungsfaktors deutlich zu sehen. Die reine ATPase enthält fünf Untereinheiten ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$), wobei die δ -Bande zweigipflig erscheint. Dies scheint auf eine irreversible Konformationsänderung während der Probenvorbereitung zurückzuführen zu sein (A.Binder, persönliche Mitteilung). Das Vorhandensein der δ -Untereinheit bei Verwendung der Chloroform-Methode war abhängig von der Menge an eingesetztem Ausgangsmaterial. Wenn mehr als 1kg Spinat pro Ansatz verwendet wurde, fehlte diese Untereinheit aus nicht bekannten Gründen fast vollständig.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit den verwendeten Präparationsmethoden Kopplungsfaktor von hoher Reinheit und spezifischer Aktivität, gemessen an Werten aus der Literatur, in sehr kurzer Zeit isoliert werden konnte.

In der Literatur finden sich verschiedene Angaben über das Molekulargewicht des Spinat-Kopplungsfaktors. Verglichen mit den entsprechenden Enzymen aus Mitochondrien oder Bakterienmembranen scheint aber die Spinat-ATPase etwas kleiner zu sein. Angegebene Werte schwanken zwischen 250'000 daltons (49) und 350'000 daltons (50). Ueblicherweise wird ein von Farron und Racker (44) durch Gleichgewichts-Ultrazentrifugation bestimmter Wert von 326'000 daltons als Molekulargewicht angenommen. Für die Berechnung einer Mol/Mol-Stöchiometrie zwischen dem Kopplungsfaktor und den daran gebundenen Nukleotiden ist natürlich entscheidend, von welchem Molekulargewicht ausgegangen wurde. Die Werte in dieser Arbeit basieren auf einem Molekulargewicht von 326'000 daltons.

4.2. AUFTRENNUNG DES EXTRAKTES

Die Auftrennung des Extraktes wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie die Trennung der Markernukleotide (Kapitel 3.5.). Die Probleme, die sich aus der Probenaufbereitung ergaben und deren Beseitigung wurden schon erwähnt (3.3. und 3.5.).

Wie Figur 6 zeigt, konnte der Extrakt so vorbehandelt werden, dass neben den Nukleotiden nur kleine Mengen an Verunreinigungen vorhanden waren, die jedoch deren Auftrennung und Mengenbestimmung nicht beeinträchtigten.

Probe: 250ul neutralisierter
Extrakt

Elution: $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.4M pH 3.5

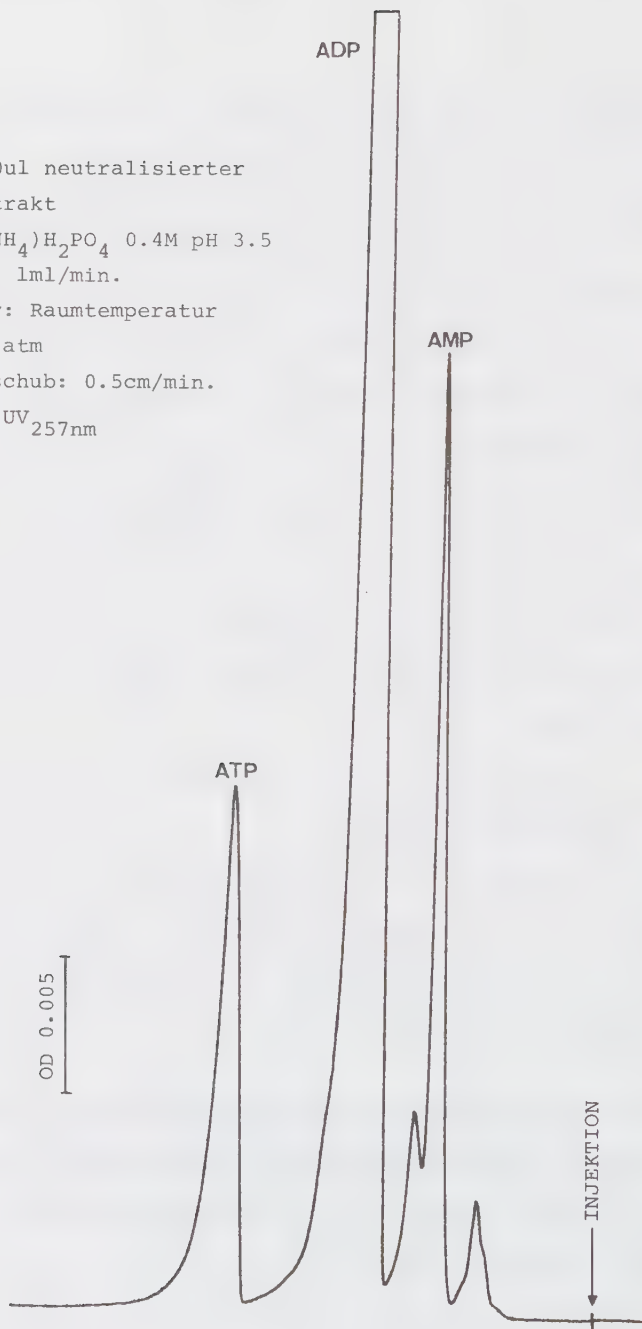
Flussrate: 1ml/min.

Temperatur: Raumtemperatur

Druck: 70 atm

Papiervorschub: 0.5cm/min.

Detektor: UV_{257nm}



Figur 6: AUFTRENNUNG DES EXTRAKTES

In den folgenden Kapiteln (4.2.3. bis 4.2.8.) werden die Resultate aus den verschiedenen Ansätzen mit den unterschiedlichen Inkubationsbedingungen der Membranen aufgeführt und teilweise mit Literaturwerten kurz verglichen.

Eine Zusammenstellung der Resultate mit ausführlicher Diskussion folgt in Abschnitt 4.9.

4.3. NUKLEOTIDE AM KOPPLUNGSFAKTOR AUS CHLOROPLASTEN OHNE VORBELICHTUNG

Harris und Slater (22) konnten aus gewaschenen Chloroplastenmembranen 2Mol ATP und 1Mol ADP pro Mol Kopplungsfaktor extrahieren. Der Gehalt an AMP war wesentlich tiefer und schwankte von Präparation zu Präparation sehr stark.

Beim Ablösen des Kopplungsfaktors von den Membranen durch EDTA gingen auch die membrangebundenen Nukleotide verloren, woraus geschlossen wurde, dass diese Nukleotide am Kopplungsfaktor gebunden waren. Am isolierten Protein konnten sie in keinen Analysen gebundenes AMP nachweisen und ADP und ATP war in etwa gleichen Mengen vorhanden. Roy und Moudrianakis (15) fanden am isolierten Enzym bis zu zwei gebundene Moleküle ADP pro Kopplungsfaktor.

Um überhaupt Veränderungen im Nukleotidgehalt des Kopplungsfaktors während der ATP-Synthese feststellen und interpretieren zu können, mussten zuerst die Verhältnisse im nicht energetisierten Zustand untersucht werden. Die Nukleotidzusammensetzung am Kopplungsfaktor, isoliert aus nicht vorbelichteten (energetisierten) Chloroplastenmembranen, sollte als Grund- oder Ausgangszustand bestimmt werden.

Chloroplasten wurden in völliger Dunkelheit aus Spinatblättern isoliert, welche während mindestens fünfzehn Stunden ohne Licht im Kühlraum aufbewahrt wurden. Am isolierten und gereinigten Kopplungsfaktor wurde die Nukleotidanalyse durchgeführt. Bei keinem der Extraktions- oder Reinigungsschritte waren zusätzliche Nukleotide beigegeben, so dass keine Verfälschung durch nicht ursprünglich vorhandene Nukleotide zu erwarten war. Das Resultat ist in Tabelle 8 gezeigt.

	<u>gebundene AdN</u> (Mol/Mol) CF ₁
AMP	0.10
ADP	1.05
ATP	0.64
total	1.79

Tabelle 8: ANALYSE DER FESTGEBUNDENEN NUKLEOTIDE NACH DUNKELINKUBATION.
(Erklärungen im Text)

Total wurden also etwa 1.8 Adeninnukleotide nachgewiesen, die während der Reinigung an der ATPase gebunden blieben. Im Gegensatz zu den an ganzen Membranen erhaltenen Werten fällt auf, dass am isolierten CF₁ das Verhältnis zwischen ADP und ATP annähernd zwei zu eins ist, während an den Membranen ein solches von eins zu zwei ermittelt wurde. Daneben kommt vor allem dem Nachweis von AMP eine grosse Bedeutung zu, indem gezeigt werden konnte, dass auch nach Isolierung und Reinigung des Kopplungsfaktors AMP gebunden bleiben kann. Dieses Resultat steht im Widerspruch mit den von Harris und Slater (22) gefundenen Werten. Damit könnte ein Hinweis auf eine direkte Beteiligung von AMP bei der ATP-Synthese erbracht worden sein.

4.4. FESTGEBUNDENE NUKLEOTIDE NACH PHOSPHORYLIERUNG

Chloroplastenmembranen wurden unter Bedingungen der steady-state-Phosphorylierung während 60 Sekunden inkubiert. Die Membranen wurden sofort vom Inkubationsmedium getrennt und die freien Nukleotide gewaschen, der Kopplungsfaktor extrahiert, gereinigt und die festgebundenen Nukleotide bestimmt. Die Werte sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

	<u>gebundene AdN</u> (Mol/Mol)
	CF ₁
AMP	0.06
ADP	1.21
ATP	0.70
total	1.97

Tabelle 9: ANALYSE DER FESTGEBUNDENEN NUKLEOTIDE NACH PHOSPHORYLIERUNG.

Phosphorylierungsbedingungen wie in Tabelle 1.

4.5. FESTGEBUNDENE NUKLEOTIDE NACH AUSTAUSCHREAKTION

Die Resultate aus Kapitel 3 zeigen, dass Chloroplastenmembranen im Licht festgebundene Nukleotide ersetzen können durch zugegebene, exogene Nukleotide. Insgesamt konnten bis $0.6 \text{ Mol } ^{14}\text{C-AdN}$ pro Mol Kopplungsfaktor eingebaut werden, die auch nach Isolierung und Reinigung des Proteins noch gebunden blieben.

Die Analyse der festgebundenen Nukleotide nach einer solchen Austauschreaktion ist in Tabelle 10 gezeigt.

	<u>gebundene AdN</u>		Radioaktivität ^{14}C (% cpm in total AdN) eingebaut in AMP/ADP/ATP
	CF_1 Mol/Mol	% des total	
AMP	0.07	4	13
ADP	1.10	58	82
ATP	0.71	38	5
total	1.88	100	100

Tabelle 10: ANALYSE DER FESTGEBUNDENEN NUKLEOTIDE NACH
AUSTAUSCHREAKTION.

Reaktionsbedingungen wie für Tabelle 2.

Aus dem totalen Gehalt an AMP, ADP und ATP verglichen mit den prozentualen Anteilen an eingebauter Radioaktivität geht deutlich hervor, dass vor allem das AMP sehr stark markiert wird, während nur wenig Radioaktivität in ATP gefunden wird.

4.6. DER EINFLUSS DES ADENYLATKINASE-INHIBITORS DIADENOSIN-5'-PENTAPHOSPHAT (AP5A) AUF DIE NUKLEOTIDZUSAMMENSETZUNG AM KOPPLUNGSFAKTOR,

Der isolierte Kopplungsfaktor katalysiert eine ADP-ADP-Transphosphorylierung, welche nicht einer Verunreinigung durch die bekannte Adenylatkinase (E.C.2.7.4.3.) zugeschrieben werden kann (52). Um abzuklären, ob das gefundene festgebundene AMP ebenfalls auf eine Aktivität der membrangebundenen ATPase zurückzuführen oder durch Restaktivitäten konventioneller Adenylatkinase entstanden ist, wurden die Ansätze für die Phosphorylierung und Austauschreaktion in Anwesenheit von P^1, P^5 -Di(Adenosin-5'-)Pentaphosphat wiederholt.

Dieser Hemmstoff unterbindet die Aktivität der Adenylatkinase (Umwandlung von ADP zu AMP und ATP) bei einer Konzentration von 10uMolar vollständig, ohne die Phosphorylierung zu beeinträchtigen (51).

Chloroplastenfragmente wurden mehrmals mit verdünnter NaCl-Lösung gewaschen und dadurch die Adenylatkinase praktisch vollständig entfernt. Der Hemmstoff sollte im Ansatz vorhandene Restaktivitäten vollständig verhindern. Wie der Tabelle 11 zu entnehmen ist, kann das Verteilungsmuster der Adeninnukleotide am Kopplungsfaktor nicht durch Einwirkung fremder Adenylatkinase-Aktivität erklärt werden.

	Phosphorylierung		Austauschreaktion	
	<u>gebundene AdN</u> (Mol/Mol)		<u>gebundene AdN</u> (Mol/Mol)	
	CF 1		CF 1	
	+ AP_5A	- AP_5A	+ AP_5A	- AP_5A
AMP	0.05	0.06	0.06	0.07
ADP	1.30	1.21	1.21	1.10
ATP	0.61	0.70	0.70	0.71
total	1.96	1.97	1.97	1.88

Tabelle 11: EINFLUSS VON AP_5A AUF FESTGEBUNDENE NUKLEOTIDE
UNTER BEDINGUNGEN DER PHOSPHORYLIERUNG UND DER
AUSTAUSCHREAKTION.

Bedingungen: Die Inkubationen wurden unter den in
Abschnitt 3.1. angegebenen Bedingungen durchgeführt.
Die Hemmstoffkonzentration betrug 10uMolar.

4.7. DER EINFLUSS VON PHLORIZIN AUF DIE NUKLEOTIDE AM CF₁

Der Energietransfer-Inhibitor Phlorizin hemmt die steady-state Phosphorylierung bei einer Konzentration von 5mMolar um mehr als 95% (31). Der Einfluss bei dieser Konzentration auf die Zusammensetzung der Adeninnukleotide am Kopplungsfaktor ist in Tabelle 12 gezeigt.

	Phosphorylierung $\frac{\text{gebundene AdN}}{\text{CF}_1} (\text{Mol/Mol})$		Austauschreaktion $\frac{\text{gebundene AdN}}{\text{CF}_1} (\text{Mol/Mol})$		% cpm	
	- Phlorizin	+ Phlorizin	-Phlorizin	+Phlorizin	-	+
AMP	0.06	0.05	0.07	0.06	13	10
ADP	1.21	1.20	1.10	1.11	82	85
ATP	0.70	0.79	0.71	0.70	5	5

Tabelle 12: EINFLUSS VON PHLORIZIN AUF FESTGEBUNDENE NUKLEOTIDE NACH PHOSPHORYLIERUNG AUF AUSTAUSCHREAKTION. Bedingungen wie Tabelle 1 und 2, Phlorizin 5mM.

In Uebereinstimmung mit Resultaten anderer Arbeiten (19/31) zeigt sich, dass der am CF₁ wirkende Hemmstoff Phlorizin keinen Einfluss auf die Synthese der gebundenen Nukleotide oder deren Austausch hat.

4.8. PHOSPHORYLIERUNG DER ENDOGENEN NUKLEOTIDE

Chloroplastenfragmente wurden in Anwesenheit von ³²-P in einem Phosphorylierungsmedium ohne exogene Nukleotide belichtet (60 Sekunden). Dadurch konnte eine spezifisch höhere Markierung der festgebundenen Nukleotide erhalten werden.

	$\frac{\text{gebundene AdN}}{\text{CF}_1} (\text{Mol/Mol})$	$\frac{\text{AdN } ^{32}\text{P}}{\text{AdN total}} (\%)$	% der totalen 32p-Markierung
AMP	0.05	-	-
ADP	0.80	0.7	29
ATP	0.90	1.7	71

Tabelle 13: ANALYSE DER FESTGEBUNDENEN NUKLEOTIDE NACH
PHOSPHORYLIERUNG OHNE ZUSÄTZLICHES ADP.
Bedingungen wie Tabelle 1, jedoch ohne ADP.

Verglichen mit der normalen Phosphorylierung mit ADP im
Medium ist ein erhöhter ATP-Gehalt auf Kosten von ADP zu
beobachten. Das Verhältnis der eingebauten Markierung fällt
mit 2.5 ATP zu 1 ADP deutlich zugunsten des ATP aus.

4.9. ZUSAMMENFASSUNG DER RESULTATE AUS DEN VERSCHIEDENEN ANSÄTZEN UND DISKUSSION

Die Tabellen 8 bis 13 sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

	gebundene AdN/CF ₁ (Mol/Mol)			Radioaktivität (%)cpm des total		
	AMP = (%)	ADP = (%)	ATP = (%)	AMP	ADP	ATP
Dunkelinkubation	0.10 (6)	1.05 (59)	0.64 (35)			
Phosphorylierung						
-Kontrolle	0.06 (3)	1.21 (61)	0.70 (36)			
-mit Ap ₅ A	0.05 (3)	1.30 (66)	0.61 (31)			
Austauschreaktion						
-Kontrolle	0.07 (4)	1.10 (58)	0.71 (38)	13	82	5
-mit Ap ₅ A	0.06 (3)	1.21 (61)	0.70 (36)			
Phlorizin						
-Phosphorylierung	0.05 (2)	1.20 (59)	0.79 (39)			
-Austauschreaktion	0.06 (3)	1.11 (59)	0.70 (38)	10	85	5
Phosphorylierung der endogenen Nukleotide	0.05 (3)	0.80 (46)	0.90 (51)	-	29	71

Tabelle 14: ZUSAMMENFASSUNG DER TABELLEN 8 BIS 13

4.9.1. Zum Verhalten der festgebundenen Adeninnukleotide unter verschiedenen Bedingungen.

Die Bezeichnung 'festgebunden' ist methodischen Ursprungs und bedeutet, dass diese Nukleotide nach Extraktion des Kopplungsfaktors und dessen Reinigung noch am Protein stabil gebunden bleiben. Aufgrund von vielen Arbeiten steht heute fest, dass Chloroplasten festgebundene Nukleotide enthalten, welche nicht kovalent am Kopplungsfaktor assoziiert sind. Die angegebene Stöchiometrie schwankt jedoch zwischen eins und vier nMol/mg Chlorophyll.

Ausgehend von der Annahme, dass diese festgebundenen Nukleotide eine Rolle spielen bei der elektronentransport-getriebenen ATP-Synthese, wurde deren Verhalten (Anzahl total gebundener Nukleotide am Kopplungsfaktor und Verteilung auf AMP, ADP und ATP) unter verschiedenen Inkubationsbedingungen der Membranen untersucht, indem die Nukleotide am isolierten und gereinigten Kopplungsfaktor analysiert wurden. Um von dieser Analyse Rückschlüsse auf die an den Membranen ablaufenden Reaktionen ziehen zu können, dürfen während der Extraktion und Reinigung der ATPase keine Veränderungen ablaufen. Hinweise auf die Richtigkeit dieser Annahme wurden aus Analysen der verschiedenen Reinigungsschritte erhalten. Es zeigte sich, dass während der Reinigung des Protein-Nukleotidkomplexes sich der erste erfassbare Zustand (Rohextrakt) nur unwesentlich veränderte.

Bei Dunkelheit bleiben diese Nukleotide fest an der ATPase gebunden, selbst wenn der Kopplungsfaktor von der Membran abgetrennt und homogen gereinigt wird. Am Kopplungsfaktor, isoliert aus nicht energetisierten Membranen, wurden etwa ein gebundenes ADP, etwas weniger ATP und nur kleine Mengen AMP gefunden. Ursache für die nicht ganzzahligen Stöchiometrien könnte sein, dass die isolierten Kopplungsfaktoren keine homogene Population bilden, sondern eine Mischung aus verschiedenen Zuständen sind, die sich in bezug auf ihren Nukleotidgehalt unterscheiden. Dass auch in intakten Membranen verschiedene Zustände des Kopplungsfaktors in bezug auf den Gehalt an gebundenen Nukleotiden gefunden wurden (42), kann diese Interpretationsmöglichkeit erhärten. Dadurch wird in den folgenden Ueberlegungen weniger auf die Stöchiometrien zwischen Protein und den einzelnen Nukleotiden als vielmehr auf die Veränderungen des Verteilungsmusters unter veränderten Membraninkubationen Gewicht gelegt.

Gebundene Nukleotide werden bei Belichtung der Membranen von der ATPase freigesetzt. Diese Freisetzung geschieht vor allem unter den Bedingungen der Phosphorylierung und der Austauschreaktion. Kopplungsfaktoren aus phosphorylierenden Chloroplasten zeigten denn auch ein anderes Nukleotidmuster als dasjenige aus nicht energetisierten Membranen. Auffallend ist das Absinken des AMP-Gehaltes bei gleichzeitigem Ansteigen der Menge gebundenem ADP und vor allem ATP. Unter phosphorylierenden Bedingungen ohne exogenes ADP kann $^{32}\text{P}_a$ in die festgebundenen Nukleotide eingebaut werden.

Ebenfalls unter energetisierenden Bedingungen können Chloroplasten einen raschen Austausch zwischen den gebundenen und freien Nukleotiden in Lösung katalysieren. Somit sind sowohl der Adenin- wie auch der Phosphatteil der festgebundenen Nukleotide austauschbar mit denen von Nukleotiden und anorganischem Phosphat in Lösung. Die einfachste Erklärung dazu liegt in der Annahme einer Konformationsänderung des Kopplungsfaktors unter energetisierten Bedingungen. Dass an der ATPase Konformationsänderungen ablaufen können, wurde schon mit verschiedenen Methoden nachgewiesen (54/55). Kontrollexperimente mit dem Adenylatkinase-Hemmstoff $A_{P_5}A$ zeigten keine Veränderungen der Nukleotidzusammensetzung am Kopplungsfaktor. Somit kann der gefundene Gehalt an festgebundenem AMP nicht das Resultat einer Enzymaktivität der Adenylatkinase sein, sondern könnte direkt am Kopplungsfaktor gebildet worden sein. Die Bildung von festgebundenem AMP aus ADP oder ATP durch den isolierten Kopplungsfaktor konnte gezeigt werden (52).

4.9.2. Zur Natur des primären Phosphatakzeptors.

Die Rückreaktion der ATP-Synthese (ATP-Hydrolyse) am isolierten Kopplungsfaktor und in der Membran erfolgt über eine Spaltung der $ADPO-PO_3$ Phosphor-Sauerstoff Bindung. Während der elektronentransportgetriebenen Phosphorylierung wird bei Verwendung von ADP und radioaktivem Phosphat vorwiegend γ - ^{32}P -ATP gebildet.

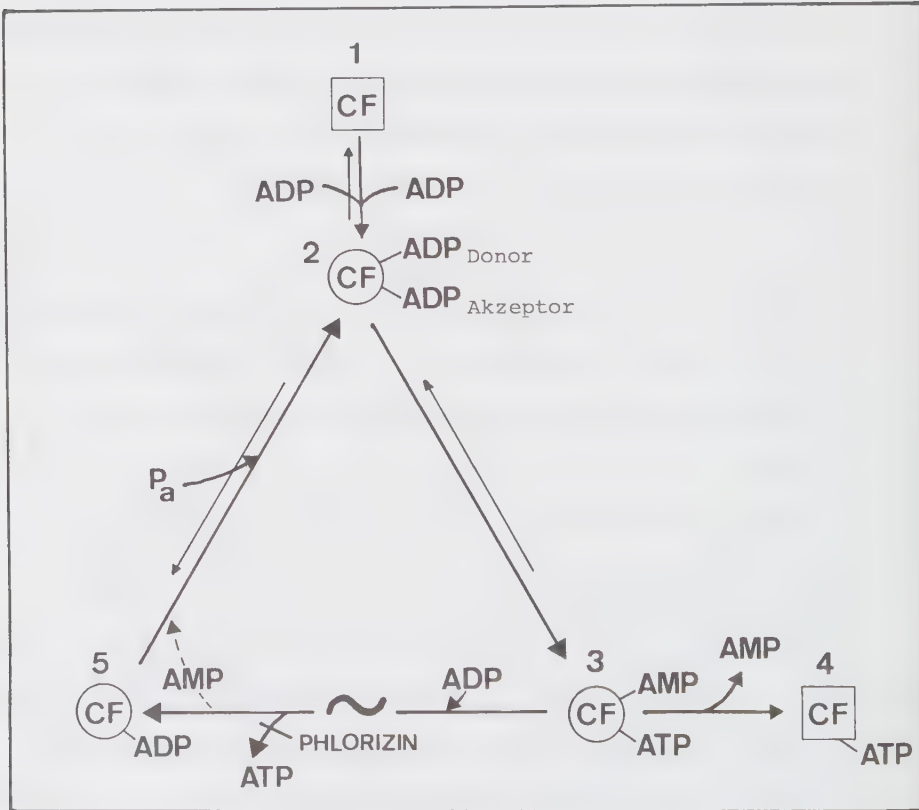
Die Phosphorylierung scheint also einfach eine Umkehrreaktion der ATP-Hydrolyse zu sein, bei der an einer aktiven Stelle am Enzym freies ADP und anorganisches Phosphat gebunden und zu ATP umgeformt werden. Da aber die Charakterisierung der verschiedenen Nukleotidbindungsstellen am Kopplungsfaktor ein komplexeres Bild zeigten, als dies eine einfache Phosphorylierung von ADP erwarten liesse, muss eine andere Reaktionsfolge der ATP-Synthese in Betracht gezogen werden. Die kinetischen Untersuchungen im Millisekundenbereich von Beyeler und Bachofen (41) zeigten, dass Chloroplastenmembranen, inkubiert mit ADP und radioaktivem Phosphat, neben ATP auch markiertes ADP bilden. Der Phosphateinbau erfolgt in ADP rascher als derjenige in ATP. Dies schliesst eine Beteiligung von Adenylatkinase-Aktivität aus, bei welcher die photosynthetisch veresterte γ -Phosphatgruppe von ATP auf AMP übertragen würde. Zugegebenes AMP und anorganisches Phosphat hemmen weiter den Elektronentransport in Chloroplasten und stimulieren unter gewissen Bedingungen einen ATP-P_a -Austausch (56). Zusammen mit der beschriebenen Transphosphorylierungs-Reaktion an einigen isolierten Kopplungsfaktoren (52/57/58) geben diese Resultate Anlass zur Annahme, dass die Phosphorylierung von AMP zu ADP ein notwendiger intermediärer Schritt der ATP-Synthese sein könnte (56). Wenn diese Transphosphorylierung auch in vivo abläuft, könnte die ATP-Synthetase selbst aus zugegebenem ADP die benötigte Menge AMP bilden.

Der Annahme von AMP als primärem Akzeptor widersprechen Resultate aus Chloroplasten, bei denen durch Säure-Basen Uebergang oder Belichtung durch kurze Blitze eine β -Markierung von ADP oder ATP durch radioaktives Phosphat wesentlich langsamer erfolgte als die Phosphorylierung und eine Markierung von zugegebenem AMP nicht beobachtet wurde (12). Daraus wurde AMP als primärer Phosphatakzeptor der Phosphorylierung ausgeschlossen. Eine Mehrzahl der den Mechanismus der ATP-Synthese diskutierender Arbeiten bevorzugen eine direkte Addierung von Phosphat zu ADP für die Bildung von ATP. In einer kürzlich erschienenen Arbeit von Tiefert und Moudrianakis (59) wurden jedoch erneut einige gute Hinweise auf eine direkte Beteiligung von AMP gezeigt, indem nachgewiesen werden konnte, dass AMP in einer energieabhängigen Reaktion zusammen mit anorganischem Phosphat in ADP umgewandelt wird, welches anschliessend als phosphoryliertes Zwischenprodukt das γ -Phosphat im ATP liefert.

Es konnte gezeigt werden (Tabelle 14), dass am isolierten Kopplungsfaktor AMP gebunden bleibt. Die experimentellen Bedingungen nach der Extraktion des Enzyms aus der Membran lassen eine nachträgliche Transphosphorylierung an der isolierten ATPase ausschliessen. Somit konnte ein Hinweis auf eine in vivo Bildung von AMP aus ADP durch Transphosphorylierung gefunden werden.

4.9.3. Ein Modell zum Reaktionsablauf der ATP-Synthese

Figur 7 zeigt einen möglichen Reaktionsverlauf der ATP-Synthese, welcher die Resultate der Nukleotidzusammensetzung nach unterschiedlicher Membraninkubation (Tabelle 14) sowie einige neuere Daten verschiedener Arbeitsgruppen erklären könnte.



Figur 7: HYPOTHETISCHES MODELL DER ATP-SYNTHESE

Erklärungen im Text.

○ aktive Konformationen des Kopplungsfaktors

□ inaktive Konformation des Kopplungsfaktors

An einer nukleotidfreien Konformation des Kopplungsfaktors (Zustand 1) binden zwei ADP-Moleküle (Zustand 2). Durch gerichtete Transphosphorylierung werden die beiden ADP-Moleküle umgewandelt in AMP und ATP (Zustand 3). In einer energieabhängigen Reaktion wird das gebildete ATP gegen ADP aus dem Medium ausgetauscht (Zustand 5). Die Freisetzung des ATP wird gehemmt durch Phlorizin. Das lose gebundene AMP verbindet sich im Medium mit anorganischem Phosphat zu ADP, welches wieder am Kopplungsfaktor fest gebunden wird. Unter kontinuierlichen Bedingungen bilden die Uebergänge von Zustand 2 zu 3, 3 zu 5 und 5 zu 2 einen Zyklus. Die Energiezufuhr (Licht) bestimmt dabei die Reaktionsrichtung. Im Folgenden werden die einzelnen Reaktionsschritte diskutiert.

Der Uebergang vom Zustand 1 in den Zustand 2, das heisst die Initialisierung der ATP-Synthese durch exogenes ADP, basiert auf der Beobachtung, dass das erste gebildete ATP-Molekül aus ADP vom Medium und nicht aus festgebundenem ADP stammt (60/61).

Die nachfolgende Transphosphorylierung wurde am isolierten Kopplungsfaktor bestätigt (52/58). Da während einer kontinuierlichen Phosphorylierung das anorganische Phosphat fast ausschliesslich in die γ -Position von ATP eingebaut wird (39), muss geschlossen werden, dass diese Transphosphorylierung gerichtet verläuft. Damit haben die beiden ADP-Bindungsstellen am Kopplungsfaktor (Zustand 2) verschiedene Funktionen, indem das eine ADP als Phosphatdonor, das andere als Phosphatakzeptor dient.

Die beiden Bindungsstellen sind somit nicht austauschbar.

Wie erwartet sollte demnach der Adeninteil des festgebundenen ADP (Donor) nicht in das freigesetzte ATP eingebaut werden, wenn exogenes ADP (Akzeptor) zugegeben wird (60).

Der von Beyeler und Bachofen (41) beobachtete äusserst schnelle Phosphateinbau in die β -Stellung von ATP während den ersten Millisekunden könnte darauf zurückzuführen sein, dass in einer Anfangsphase die Transphosphorylierung nicht absolut gerichtet verläuft.

Wichtig ist der Umstand, dass das Donor-Nukleotid nur sehr vorübergehend als AMP gebunden bleibt. Aus diesem Grunde enthalten gewaschene Chloroplastenmembranen nur sehr wenig oder gar kein gebundenes AMP und während der Reinigung der Kopplungsfaktor-ATPase geht das AMP meistens verloren.

Dass aber auch der isolierte und gereinigte Kopplungsfaktor gebundenes AMP enthalten kann, wurde in dieser Arbeit gezeigt. Zugegebenes AMP bindet nicht nachweisbar am isolierten Kopplungsfaktor (15), der Uebergang vom Zustand 3 in Zustand 4 ist irreversibel. Der Adenosinteil von AMP scheint nur an den membrangebundenen Kopplungsfaktor zurückzubinden, wenn er umgeformt wurde zu ADP (15/59). Unter gewissen Umständen enthält eine Population gereinigter Kopplungsfaktoren sowohl gebundenes ADP wie auch ATP (Zustände 4 und 5).

Slater et al. (10) und Boyer et al. (11) folgerten aus Austausch- und Hemmstoffstudien, dass der energieabhängige Schritt der enzymatischen Phosphorylierung von ADP nicht die Phosphatveresterung, sondern das Ablösen des gebildeten ATP vom Enzym unter Aufnahme eines ADP aus dem Medium sei.

Phlorizin hemmt die ATP-Synthese praktisch vollständig, ohne den Einbau von radioaktivem Phosphat in die festgebundenen Nukleotide zu beeinflussen. Ebenfalls nicht gehemmt durch Phlorizin wird die Transphosphorylierung der isolierten ATPase (62). Daraus kann geschlossen werden, dass der Hemmeffekt von Phlorizin für die steady-state-Phosphorylierung in der Ablösung von synthetisiertem ATP besteht (Uebergang vom Zustand 3 in 5).

Auch wenn die festgebundenen Nukleotide direkt in der Photo-phosphorylierung beteiligt sind, brauchen Hemmstoffe der Phosphorylierung nicht unbedingt auch Hemmstoffe der Austauschreaktionen zu sein. Es ist unzulässig, die Hemmwirkung einer Phosphorylierungsrate zu vergleichen mit der Hemmung eines Endzustandes beim Austausch, der zudem noch in viel kürzerer Zeit erreicht wird.

Der Austausch von gebundenen Adeninukleotiden mit solchen im Medium zeigt dieselben Abhängigkeiten wie die Phosphorylierung in bezug auf die Parameter Lichtintensität, pH-Wert des Inkubationsmediums, Entkoppler und DCMU (63). Deshalb kann angenommen werden, dass die bei Austauschreaktionen gemessenen Konformationsänderungen (42) Teil des Mechanismus der Phosphorylierung sind und nicht Seitenreaktionen der Energetisierung darstellen. Austausch innerhalb des in Figur 7 gezeigten Ablaufes der ATP-Synthese sind möglich bei Uebergang von Zustand 1 in Zustand 2 und im Zustand 2 selbst.

Zum Schluss muss betont werden, dass der postulierte Reaktionsverlauf unter folgenden Annahmen zustande kam:

- 1) die festgebundenen Nukleotide sind direkt beteiligt in der ATP-Synthese und Veränderungen an deren Zusammensetzung sind nicht Ergebnisse von unspezifischen Nebenreaktionen.
- 2) die an der Membran eingenommene Situation in bezug auf den Nukleotidgehalt kann während der Reinigung des Kopplungsfaktors erhalten bleiben.

Hinweise auf die Richtigkeit dieser Annahmen sind vorhanden, ein Beweis kann jedoch nicht erbracht werden.

Es ist durchaus denkbar, dass weit kompliziertere Reaktionsverläufe zur ATP-Synthese führen. Das vorgestellte Modell sollte lediglich als Arbeitshypothese die gemachten Beobachtungen möglichst einfach erklären helfen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

- Spinatchloroplasten besitzen einen membrangebundenen Kopplungsfaktor, an welchem die terminalen Schritte der Photophosphorylierung katalysiert werden. Dieser Kopplungsfaktor ist der Bindungsort für die an den Membranen fest gebundenen Adeninnukleotide.
- Der Kopplungsfaktor kann zusammen mit den festgebundenen Adeninnukleotiden von der Membran abgelöst und gereinigt werden.
- Eine schonende und schnelle Extraktions- und Reinigungsmethode für die ATPase aus Chloroplasten wurde ausgearbeitet.
- Durch eine entwickelte Trennmethode mit Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie konnten die aus dem isolierten Kopplungsfaktor extrahierten festgebundenen Adeninnukleotide in sehr kleinen Mengen (weniger als ein Nanomol) analysiert werden.
- Nach unterschiedlichen Membraninkubationen konnte am isolierten Kopplungsfaktor eine veränderte Nukleotidzusammensetzung gefunden werden, aus welcher Rückschlüsse auf den Mechanismus der ATP-Synthese gezogen wurde.
- Die Beziehung zwischen den Austauschreaktionen und der ATP-Synthese wurden untersucht und diskutiert.
- Aus den erhaltenen Resultaten wurde ein Modell zum Mechanismus der ATP-Synthese mit AMP als primärem Phosphatakzeptor postuliert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) SLATER, E.C.(1966), Oxidative Phosphorylation. In: Comprehensive Biochemistry 14 (Florkin & Stotz eds.), Elsevier Publishing Co, Amsterdam
- 2) MITCHELL, P.(1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol.Rev. 41, 445
- 3) BOYER, P.D., Bieber, L.L., Mitchell, R.A. & Szabolcsi, G. (1966), The apparent independence of the phosphorylation and water formation reactions from the oxidation reactions of oxidative phosphorylation. J. Biol. Chem. 241, 5384
- 4) HIND, G. & Jagendorf, A.T.(1963), Separation of light and dark stages in photophosphorylation. Proc. Natn. Acad. Sci. USA 49, 715
- 5) TREBST, A.(1974), Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts. Ann. Rev. Plant. Phys. 23, 423
- 6) JAGENDORF, A.T. & Uribe, E.(1966), ATP-Formation caused by acid-base transition of spinach-chloroplasts. Proc. Natn. Acad. Sci. USA 55, 170
- 7) CHANCE, D.(1972), The nature of electron transfer and energy coupling reactions. F.E.B.S. Letters 23, 1
- 8) BOYER, P.D.(1967), ¹⁸O and related exchanges in enzymic formation and utilization of nucleoside triphosphates. In: Current Topics in Bioenergetics, ed.R.Sanadi, Academic Press N.Y., 2, 99
- 9) HINKSON, J.W. & Boyer, P.D.(1965), The light induced formation of rapidly phosphorylated compounds in chloroplasts. Archs. Biochem. Biophys. 110, 16
- 10) HARRIS, D.A., Rosing, J., van de Stadt, P.J.& Slater, E.C.(1973), Tight binding of adenine nucleotides to beef-heart mitochondrial ATPase. Biochem. Biophys. Acta 314, 149

- 11) BOYER, P.D., Cross, R.L. & Momsen, W. (1973),
A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation
based on a molecular explanation of the oxygen exchange
reactions. Proc. Natn. Acad. Sci. USA 70, 2837
- 12) SMITH, D.J., Stokes, B.D. & Boyer, P.D. (1976),
Probes of initial phosphorylation events in ATP synthesis
by chloroplasts. J. Biol. Chem. 251, 4165
- 13) PFLUGSHAUPT, Ch. & Bachofen, R. (1975), Bound ATP in
chloroplast membranes: formation and effect of different
inhibitors on the labelling. J. Bioenergetics 7, 49
- 14) HARRIS, D.A., John, P. & Radda, G.K. (1977),
Tightly bound nucleotides of the energy-transducing ATPase
and their role in oxidative phosphorylation.
Biochim. Biophys. Acta 459, 546
- 15) ROY, H. & Moudrianakis, E.N. (1971), Synthesis and discharge
of the coupling factor-ADP complex in spinach chloroplast
lamellae. Proc. Natn. Acad. Sci. USA 68, 2720
- 16) KAYALAR, C., Rosing, J. & Boyer, P.D. (1977),
An alternating site sequence for oxidative phosphorylation
suggested by measurement of substrate binding patterns
and exchange reaction inhibitions. J. Biol. Chem. 252, 2486
- 17) LUTZ, H.U., Dahl, J. & Bachofen, R. (1974), Synthesis of
free ATP from membrane-bound ATP in Chromatophores of
Rhodospirillum rubrum. Biochim. Biophys. Acta 347, 359
- 18) MITCHELL, P. (1967), Active transport and ion accumulation.
In: Comprehensive Biochemistry 22 (Florkin & Stotz eds.)
Elsevier Publishing Co, Amsterdam
- 19) HARRIS, D.A. (1978), The interactions of coupling ATPases
with nucleotides. Biochim. Biophys. Acta 463, 245
- 20) PEDERSEN, P.L. (1975), Mitochondrial adenosine-triphosphatase.
J. Bioenerg. 6, 243

- 21) ROSING, J., Harris, D.A., Kemp, A. & Slater, E.C. (1975),
Nucleotide-binding properties of native and cold-treated
mitochondrial ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 376, 13
- 22) HARRIS, D.A. & Slater, E.C. (1975), Tightly bound nucleotides
of the energy-transducing ATPase of chloroplasts and
their role in photophosphorylation.
Biochim. Biophys. Acta 387, 335
- 23) BACHOFEN, R., Beyeler, W. & Pflugshaupt, Ch. (1975),
Firmly bound nucleotides in photosynthetic energy trans-
duction. In: *Electron Transfer Chains in oxidative
Phosphorylation* (Quagliariello, E. et al. eds.) pp 167,
North Holland Publishing Co, Amsterdam
- 24) ROSING, J., Harris, D.A., Slater, E.C. & Kemp, A. (1975),
Possible role of tightly bound adenine-nucleotides
in oxidative and photosynthetic phosphorylation.
J. Supram. Structure 3, 284
- 25) STROTMANN, H., & Bickel-Sandkötter, S. (1977), Energy-dependent
exchange of adenine nucleotides on chloroplast coupling
factor (CF_1). *Biochim. Biophys. Acta* 460, 126
- 26) LIEN, S. & Racker, E. (1971), Preparation and assay of
chloroplast coupling factor CF_1 . In: *Methods in
Enzymology* (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. eds.) Vol XXIII,
Academic Press New York.
- 27) BINDER, A., Jagendorf, A.T. & Ngo, E. (1978), Isolation
and composition of subunits of spinach chloroplast
coupling factor protein. *J. Biol. Chem.* 253, 3094
- 28) BEECHEY, R.B., Hubbard, S.A., Linnett, P.E., Mitchell, A.D. &
Munn, E.A. (1975), Simple and rapid method for preparation
of adenosine-triphosphatase from submitochondrial particles.
Biochem. Journal 148, 533
- 29) YOUNIS, H.M., Winget, G.D. & Racker, E. (1977),
Requirement of the δ subunit of chloroplast coupling
factor I for photophosphorylation.
J. Biol. Chem. 252, 1814

- 30) STROTMANN, H. Hesse, H. & Edelmann, K. (1973),
Quantitative determination of coupling factor CF_1
of chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 314, 202
- 31) PFLUGSHAUP, Ch. (1975), Synthese und Funktion membrangebundener
Adenin-Nukleotide: Untersuchungen zum Mechanismus der
Photophosphorylierung. Thesis, Universität Zürich
- 32) ARNON, D.I. (1949), Copper enzymes in isolated chloroplasts.
Plant Physiol. 24, 1
- 33) LOWRY, O.H., Rosenbough, N.J., Farr and Randall, A.L. (1951),
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265
- 34) BENSADOUN, A. & Weinstein, D. (1976), Assay of protein
in the presence of interfering materials.
Analytical Biochemistry 70, 241
- 35) TAUSKY & Schorr (1953), A microcolorimetric method
for the determination of inorganic phosphorus.
J. Biol. Chem. 202, 675
- 36) DAVIS, B.J. (1964), Disc electrophoresis II: Method and
application to human serum proteins.
Annals N.Y. Acad. Sci. 121, 404
- 37) GOMORI (1952), Microscopic histochemistry, Principles
and Practice
- 38) LAEMMLI, U.K. (1970), Cleavage of structural proteins during
the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680
- 39) AVRON, M. (1960), Photophosphorylation by swiss-chard
chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 40, 257
- 40) CLAUSEN, T. (1968), Measurement of 32-P activity in
a liquid scintillation counter without use of scintillator.
Analytical Biochemistry 22, 70

- 41) BEYELER, W. and Bachofen, R.(1978), Initial events of light-dependent ATP synthesis in spinach subchloroplast particles. Eur. J. Biochem. 88, 61
- 42) GRAEBER, P., Schlodder, E. and Witt, H.T.(1977). Conformational change of the chloroplast ATPase induced by a transmembrane electric field and its correlation to phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta 461, 426
- 43) ZUERRER, H.(1973). Reaktionen von Pyrophosphat in Chloroplasten höherer Pflanzen. Thesis, Universität Zürich
- 44) FARRON, F.(1970). Isolation and properties of a chloroplast coupling factor and heat-activated ATPase. Biochemistry 9, 3823
- 45) MAGNUSSON, R.P. and McCarty, R.E.(1976). Acid-induced phosphorylation of adenosine 5'-diphosphate bound to coupling factor 1 in spinach chloroplast thylakoids. J. Biol. Chem. 251, 6874
- 46) VINKLER, C., Rosen, G. and Boyer, P.D.(1978). Light-driven ATP formation from 32-P_i by chloroplast thylakoids without detectable labeling of ADP, as measured by rapid mixing and acid quench techniques. J. Biol. Chem. 253, 2507
- 47) KHYM, J.X.(1975). An analytical system for rapid separation of tissue nucleotides at low pressures on conventional anion exchangers. Clinical Chemistry 21, 1245
- 48) AVRON, M.(1963). A coupling factor in photophosphorylation. Biochim. Biophys. Acta 77, 699
- 49) LYNN, W.S. and Straub, K.D.(1969). Isolation and properties of a protein from chloroplasts required for photo-phosphorylation and H^+ uptake. Biochemistry 8, 4789
- 50) MOUDRIANAKIS, E.N., Howell, S.H. and Karu, A.E.(1968). In: Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis (Shibata, K., Takamiya, A., Jagendorf, A.T. and Fuller, R.C. eds). University of Tokyo Press, Tokyo

- 51) McCarty, R.E.(1978), AMP is converted to ADP and ATP in the medium before it is bound to couplin factor 1 in illuminated spinach chloroplast thylakoids.
FEBS letters 95, 299
- 52) MOUDRIANAKIS, E.N. and Tiefert, M.A.(1976). Synthesis of bound ATP from bound ADP by the purified coupling factor 1 of chloroplasts. J. Biol. Chem. 251, 7796
- 53) KARU, A.E. and Moudrianakis, E.N.(1969), Fractionation and comparative studies of enzymes in aqueous extracts of spinach chloroplasts.
Archs. Biochem. Biophys. 129, 655
- 54) RYRIE, I.J. and Jagendorf, A.T.(1972), Correlation between a conformational change in the coupling factor protein and the high energy state in chloroplasts.
J. Biol. Chem. 247, 4453
- 55) KRAAYENHOF, R. and Slater, E.C.(1975), in Proceedings of the third International Congress on Photosynthesis (Avron, M. ed.), Vol II, Seite 985 ff, North-Holland
- 56) VAMBUTAS, V. and Bertsch, W.(1976), Does AMP participate in photosynthetic phosphorylation ?
Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 686
- 57) CANTLEY, L.C. and Hammes, G.G.(1975), Characterization of nucleotide binding sites on chloroplast coupling factor 1. Biochemistry 14, 2968
- 58) HOFMANN, M.E. and Bachofen, R.(1977), Binding and reaction studies with adenine nucleotides on purified coupling factor from Rhodospirillum rubrum.
J. Bioenergetics and Biomembranes 9, 349
- 59) TIEFERT, M.A. and Moudrianakis, E.N.(1979), Role of AMP in photophosphorylation by spinach chloroplasts.
J. Biol. Chem. 254, 9500

- 60) ROSING, J., Smith, D.J., Kayalar, C. and Boyer, P.D.(1976), Medium ADP and not ADP already tightly bound to thylakoid membranes forms the initial ATP in chloroplast phosphorylation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 72. 1
- 61) SHAVIT, N., Lien, S. and SanPietro, A.(1977), On the role of membrane-bound ADP and ATP in photophosphorylation in chloroplast membranes. FEBS letters 73, 55
- 62) TIEFERT, M.A., Roy. H. and Moudrianakis, E.N.(1977), Conversion of bound adenine nucleotides by the purified coupling factor of photophosphorylation. Biochemistry 16, 2404
- 63) BICKEL-SANDKOETTER, S. and Strotmann, H.(1976), Effects of external factors on photophosphorylation and exchange of CF_1 -bound adenine nucleotides. FEBS letters 65, 102

7. ANHANG

7.1. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AdN	Adeninnukleotid(e)
Ap ₅ A	P ¹ ,P ⁵ -diAdenosin-5'-Pentaphosphat
BSA	Rinderserum Albumin
CCCP	Carbonylcyanid-3-chlorophenyl-hydrazon
CF	Kopplungsfaktor (=ATPase)
Chl	Chlorophyll
DTT	Dithiothreit
EDTA	Aethylendiamin-tetraessigsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
P _a	anorganisches Phosphat
PCA	Perchlorsäure
PMS	N-Methylphenazonium Methosulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tricine	N-Tris(hydroximethyl)-methyl Glycin
Tris	1,1,1-Tris(hydroximethyl)-aminomethan

7.2. VERDANKUNGEN

Die vorliegende Arbeit ist am Institut für Pflanzenbiologie (Abteilung Mikrobiologie) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Bachofen entstanden. Ich danke ihm, dass er mich auf die interessanten Probleme der Photosynthese hingewiesen hat, für seine wertvollen Anregungen und seine stets gewährte Unterstützung während der Ausführung der Arbeiten.

Herrn Dr. P. Rüedi, Organisch-Chemisches Institut der Universität Zürich, danke ich für seine Mithilfe beim Packen der Hochdruck-Säulen.

CURRICULUM VITAE

B O D M E R, Stefan, von Zürich ZH,

geboren am 9. August 1949 in Zürich

- 1956 - 1964 Primar- und Sekundarschule in Zürich und
 Celerina GR
- 1964 - 1969 Kantonale Oberrealschule Zürich, Abschluss mit
 Maturität Typus C
- 1969 - 1976 Studium an der Philosophischen Fakultät II der
 Universität Zürich mit Hauptfach Mikrobiologie
 1. Vorprüfung: Mathematik und Organische Chemie
 2. Vorprüfung: Allgemeine Zoologie
 Allgemeine Botanik
 Propädeutische Mikrobiologie
 Schlussprüfung: Mikrobiologie, Molekularbiologie
 und Biochemie
- 1973 - 1976 Diplomarbeit unter der Leitung von Herrn Prof.
 Dr. R. Bachofen
- 1976 - 1979 Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof.
 Dr. R. Bachofen
- Seit 1975 Halbassistent am Institut für Pflanzenbiologie
- Seit 1977 Lehrbeauftragter der Philosophischen Fakultät II

Während meiner Studienzeit besuchte ich bei folgenden Dozenten
Vorlesungen, Kurse und Praktika:

Mikrobiologie: Prof. Bachofen, Prof. Hohl, Prof. Lindenmann,
 Prof. Knüsel, Prof. Wiesmann, Dr. Schneider

Molekularbiologie: Prof. Weissmann, Prof. Billeter, Dr. Weber,
 Dr. Clarkson, Prof. Birnstiel

Biochemie: Prof. Leuthardt, Prof. Humbel, Prof. Kägi,
 Prof. Christen

Allgemeine und Systematische Botanik: Prof. Wanner, Prof. Cook,
Prof. Bachofen, Prof. Hohl, Prof. Rast

Allgemeine und Systematische Zoologie: Prof. Hadorn, Prof. Burla,
Prof. Tardent, Prof. Chen, Prof. Kummer,
Prof. Jungen, Prof. Wehner, Dr. Kubli

Anorganische und Organische Chemie: Prof. Eugster, Prof. Schmid,
Prof. Oswald

Mathematik: Prof. van der Waerden, Dr. Karrer, Dr. Wyler

